

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-500638

(P2015-500638A)

(43) 公表日 平成27年1月8日(2015.1.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 Q 1/68 (2006.01)	C 12 Q 1/68	Z 4 B 0 2 4
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 0 6 3
C 12 N 15/00 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A 4 C 0 8 4
A 61 K 45/00 (2006.01)	A 61 K 45/00	4 C 0 8 5
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	N

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 85 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-544721 (P2014-544721)	(71) 出願人	509012625 ジェネンテック, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ ディーエヌエー ウェイ 1
(86) (22) 出願日	平成24年11月29日 (2012.11.29)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成26年7月24日 (2014.7.24)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/000568	(72) 発明者	ジェイスワール, ビジェイ シャンカル アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー ウェイ 1
(87) 國際公開番号	W02013/081645		
(87) 國際公開日	平成25年6月6日 (2013.6.6)		
(31) 優先権主張番号	61/629,951		
(32) 優先日	平成23年11月30日 (2011.11.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌におけるE R B B 3変異

(57) 【要約】

本発明は、癌における体細胞E r b B 3変異に関し、E r b B 3癌を特定、診断、および予後診断する方法、ならびに癌を治療する方法を含み、患者のある亜集団を含む。

【選択図】図4

Fig. 1A

Sample ID	New Name	Matched Normal Sample ID	Disease Category	Tissue Subcategory	Tissue Diagnosis	Whole exome sequencing (WES)
48234	HP-1227	AT021	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48412	HP-1261(2)	74591	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
53504	HP-1260(2)	93591	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
49335	HP-1260(3)	59593	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48113	HP-1263(1)	98113	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
49127	HP-1263(2)	10113	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48231	HP-1263(3)	70593	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48445	HP-1264(1)	91466	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48450	HP-1264(2)	92656	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
49137	HP-1265(1)	97911	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48163	HP-1266(1)	741361	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48193	HP-1267(1)	101399	Ovarian Cancer		Adenocarcinoma	
48492	HP-1268(1)	80927	Non-Small Cell Lung Cancer		Carcinoma, Non-Small Cell	
48495	HP-1269(2)	148682	Non-Small Cell Lung Cancer		Adenocarcinoma	
48496	HP-1270(1)	171122	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48497	HP-1270(2)	17522	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48427	HP-1288	57322	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48441	HP-2446	27232	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48442	HP-3325	87329	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48239	HP-3446	87358	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48429	HP-3448	77358	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48147	HP-1290(1)	53146	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
53106	HP-1290(1)	93146	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48136	HP-1428(1)	93234	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
53142	HP-1428(1)	93146	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
53131	HP-1335(1)	93131	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
53028	HP-1335(2)	93502	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48460	HP-1464(1)	51659	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
53631	HP-1465(1)	93631	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48427	HP-1502(1)	91691	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
53639	HP-1502(1)	37105	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48729	HP-1504(1)	91693	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48730	HP-1505(1)	37106	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48421	HP-1542(2)	56225	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
50139	HP-1570(1)	95139	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	
48143	HP-1584(1)	94143	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48455	HP-1818(1)	92649	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes
48496	HP-1818(2)	92650	Colorectal Cancer		Adenocarcinoma	yes

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E r b B 3 核酸配列中の E r b B 3 変異に特異的に結合することができる試薬を含む、E r b B 3 消化管癌検出薬。

【請求項 2】

前記 E r b B 3 核酸配列が、配列番号 3 または 1 を含む、請求項 1 に記載の癌検出薬。

【請求項 3】

前記試薬が、式



10

のポリヌクレオチドを含み、式中、

X は任意の核酸であり、a は約 0 ~ 約 250 であり、

Y は E r b B 3 変異コドンであり、

Z は任意の核酸であり、b は約 0 ~ 約 250 である、請求項 1 に記載の癌検出薬。

【請求項 4】

前記変異コドンが、(i) 配列番号 2 の 104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、および 1164 からなる群から選択される位置のアミノ酸、または (ii) 193 位の終止コドンをコードする、請求項 3 に記載の癌検出薬。

20

【請求項 5】

対象から得られる生体試料において E r b B 3 をコードする核酸配列中の変異を検出することを含む、前記対象における E r b B 3 消化管癌の存在を決定する方法であって、前記変異が、前記 E r b B 3 アミノ酸配列の少なくとも 1 つの位置にアミノ酸変化をもたらし、前記変異が、前記対象における E r b B 3 消化管癌を示す、方法。

【請求項 6】

アミノ酸変化をもたらす前記変異が、配列番号 2 の 104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、および 193 からなる群から選択される位置に存在する、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

対象から得られる生体試料において E r b B 3 をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することを含む、前記対象における E r b B 3 癌の存在を決定する方法であって、前記変異が、配列番号 2 の 104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、193、492、および 714 からなる群から選択される少なくとも 1 つの位置にアミノ酸変化をもたらし、前記変異の存在が、前記対象における E r b B 3 癌を示す、方法。

【請求項 8】

治療薬を前記対象に投与することをさらに含む、請求項 5 または 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

前記治療薬が、E r b B 阻害剤である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 E r b B 阻害剤が、EGFR 拮抗薬、E r b B 2 拮抗薬、E r b B 3 拮抗薬、E r b B 4 拮抗薬、および EGFR / E r b B 3 拮抗薬からなる群から選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記阻害剤が、低分子阻害剤である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記拮抗薬が、拮抗薬抗体である、請求項 10 に記載の方法。

50

【請求項 1 3】

前記抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記消化管癌が、胃癌または結腸癌である、請求項 1 に記載の検出薬または請求項 5 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 E r b B 3 癌が、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、非小細胞肺 (N S C L C) 腺癌、N S C L C (扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣、大細胞肺癌、小細胞肺癌 (S C L C)、肝細胞癌 (H C C)、肺癌、および膵臓癌からなる群から選択される、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

(i) 必要とする対象を特定すること、および / または (ii) 必要とする対象から試料を得ることをさらに含む、請求項 5 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記検出が、前記変異を增幅するか、または配列決定することと、前記変異またはその配列を検出することと、を含む、請求項 5 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記増幅が、増幅プライマーまたは増幅プライマー対を、前記試料から単離された核酸鑄型と混合することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

20

【請求項 1 9】

前記プライマーまたはプライマー対が、前記変異の近位にあるか、またはそれを含む領域に相補的であるか、または部分的に相補的であり、前記核酸鑄型上でポリメラーゼによる核酸重合を開始することができる、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

ポリメラーゼおよび前記核酸鑄型を含む D N A 重合反応において前記プライマーまたはプライマー対を伸長させて増幅産物を生成することをさらに含む、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記変異が、前記生体試料から単離されたゲノム D N A 中の前記変異を配列決定すること、前記変異もしくはその増幅産物をアレイにハイブリダイズすること、前記変異もしくはその増幅産物を制限酵素で消化すること、または前記変異のリアルタイム P C R 増幅のうちの 1 つ以上を含むプロセスにより検出される、請求項 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 2 2】

前記生体試料から単離された核酸中の前記変異を部分的または完全に配列決定することを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記増幅が、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、逆転写酵素 P C R (R T - P C R)、またはリガーゼ連鎖反応 (L C R) を、前記 P C R、R T - P C R、または L C R における鑄型としての前記生体試料から単離された核酸を用いて行うこととを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

40

【請求項 2 4】

必要とする対象における消化管癌を治療する方法であって、

a) 前記対象から得られる生体試料において E r b B 3 をコードする核酸配列中の変異を検出することであって、前記変異が、前記 E r b B 3 アミノ酸配列の少なくとも 1 つの位置にアミノ酸変化をもたらし、前記変異が、前記対象における E r b B 3 消化管癌を示す、検出することと、

b) 治療薬を前記対象に投与することと、を含む、方法。

【請求項 2 5】

アミノ酸変化をもたらす前記変異が、配列番号 2 の 1 0 4、8 0 9、2 3 2、2 6 2、

50

284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、および193からなる群から選択される位置に存在する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

対象におけるErbB3癌を治療する方法であって、
前記対象から得られる生体試料においてErbB3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することであって、前記変異が、配列番号2の104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、193、492、および714からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、前記変異の存在が、前記対象におけるErbB3癌を示す、検出することと、
b)治療薬を前記対象に投与することと、を含む、方法。

【請求項27】

前記治療薬が、ErbB阻害剤である、請求項24または26に記載の方法。

【請求項28】

前記ErbB阻害剤が、EGFR拮抗薬、ErbB2拮抗薬、ErbB3拮抗薬、ErbB4拮抗薬、およびEGFR/ErbB3拮抗薬からなる群から選択される、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

前記拮抗薬が、低分子阻害剤である、請求項28に記載の方法。

20

【請求項30】

前記拮抗薬が、拮抗薬抗体である、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

前記抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記消化管癌が、胃癌または結腸癌である、請求項24に記載の方法。

【請求項33】

前記ErbB3癌が、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、結腸直腸癌、非小細胞肺(NSCLC)腺癌、NSCLC(扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、肝細胞癌(HCC)、肺癌、および肺臓癌からなる群から選択される、請求項26に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、米国特許法第119条(e)の下で、2011年11月30日に出願された米国仮出願第61/629,951号に対する優先権の利益を主張するものであり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、癌における体細胞ErbB3変異に関し、ErbB3癌を特定、診断、および予後診断する方法、ならびに癌を治療する方法を含み、患者のある亜集団を含む。

【背景技術】

【0003】

ErbB受容体としても知られる、受容体チロシンキナーゼ(RTK)のヒト上皮成長因子受容体(HER)ファミリーは、4つのメンバー、EGFR/ERBB1/HER1、ERBB2/HER2、ERBB3/HER3、およびERBB4/HER4からなる(Hynes et al. *Nature Reviews Cancer* 5, 341-354 (2005)、Baselga et al. *Nature Reviews Cancer* 9, 463-475 (2009))。ErbBファミリーメンバーは、細

40

50

胞外ドメイン(E C D)、単スパン膜貫通領域、細胞内チロシンキナーゼドメイン、およびC末端シグナル伝達尾部を含む(Burgess et al. Mol Cell 12, 541 - 552 (2003)、 Ferguson. Annual Review of Biophysics 37, 353 - 373 (2008))。E C Dは、2つのLドメイン(I および I I I)ならびに2つの高システインドメイン(I I および I V)からなる4つのドメイン構造である(Burgess et al. Mol Cell 12, 541 - 552 (2003)、 Ferguson. Annual Review of Biophysics 37, 353 - 373 (2008))。E R B B受容体は、上皮成長因子(E G F)、形質転換成長因子- (T G F -)、およびニューレグリンを含む複数のリガンドにより活性化される(Yarden et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2, 127 - 137 (2001))。受容体の活性化は、ドメインI および I I I に同時に結合する単一リガンド分子を必要とし、ドメインI I における二量体化アームを介したヘテロ二量体化またはホモ二量体化につながる(Burgess et al. Mol Cell 12, 541 - 552 (2003)、 Ogi so et al. Cell 110, 775 - 787 (2002)、 Cho. Science 297, 1330 - 1333 (2002)、 Dawson et al. Molecular and Cellular Biology 25, 7734 - 7742 (2005)、 Alvarado et al. Cell 142, 568 - 579 (2010)、 Lemmon et al. Cell 141, 1117 - 1134 (2010))。リガンドの不在化で、ドメインI I 二量体化アームは、ドメインI V との分子内相互作用を介して挟み込まれ、「繫留された」自己抑制構成をもたらす(Burgess et al. Mol Cell 12, 541 - 552 (2003)、 Cho. Science 297, 1330 - 1333 (2002)、 Lemmon et al. Cell 141, 1117 - 1134 (2010)、 Ferguson et al. Mol Cell 11, 507 - 517 (2003))。

【0004】

4つのE R B B受容体は、類似のドメイン組織を共有するが、機能的および構造的研究は、E R B B 2 が既知のE R B B ファミリーリガンドのいずれにも結合せず、構成的に二量体化に適した「非繫留」(オープン) 構造であることを示す(Garrett et al. Mol Cell 11, 495 - 505 (2003))。対照的に、E R B B 3 は、リガンド結合、ヘテロ二量体化、およびシグナル伝達が可能であるが、傷害のあるキナーゼドメインを有する(Baselga et al. Nature Reviews Cancer 9, 463 - 475 (2009)、 Jura et al. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 21608 - 21613 (2009)、 Shi et al. Proceedings of the National Academy of Sciences 107, 7692 - 7697 (2010))。E R B B 2 およびE R B B 3 は、それら自体は機能的に不完全であるが、それらのヘテロ二量体は、細胞シグナル伝達の強力な活性剤である(Pinkas-Kramarski et al. The EMBO Journal 15, 2452 - 2467 (1996)、 Tzahar et al. Molecular and Cellular Biology 16, 5276 - 5287 (1996)、 Holbro et al. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 8933 - 8938 (2003))。

【0005】

E R B B受容体は、正常な成長および発達の重要な調節因子であるが、それらの脱制御も癌の発達および進行に関与している(Baselga et al. Nature Reviews Cancer 9, 463 - 475 (2009)、 Sithanandam et al. Cancer Gene Ther 15, 413 - 448 (2008)、 Hynes et al. Current Opinion in Cell Biology 15, 100 - 106 (2003))。

ology 21, 177-184 (2009)）。具体的には、受容体過剰発現をもたらし、体細胞変異を活性化する遺伝子増幅は、様々な癌において ERBB2 および EGFR 内で発生することが知られている (Sithanandam et al. Cancer Gene Ther 15, 413-448 (2008)、Hynes et al. Current Opinion in Cell Biology 21, 177-184 (2009)、Wang et al. Cancer Cell 10, 25-38 (2006)、Yamauchi et al. Biomark Med 3, 139-151 (2009))。これは、EGFR および ERBB2 を標的とする複数の低分子および抗体に基づく治療法の開発をもたらした (Baselga et al. Nature Reviews Cancer 9, 463-475 (2009)、Alvarez et al. Journal of Clinical Oncology 28, 3366-3379 (2010))。腫瘍形成における ERBB4 の正確な役割は、十分に確立されていないが (Koutras et al. Critical Reviews in Oncology/Hematology 74, 73-78 (2010))、ERBB4 内の形質転換体細胞変異が黒色腫において報告されている (Prickett et al. Nature Genetics 41, 1127-1132 (2009))。近年、ERBB2 シグナル伝達において重要な役割を果たし、既存の治療法に対する耐性を促進することにも関与することを考慮し、ERBB3 が有力な癌治療標的として浮上した (Baselga et al. Nature Reviews Cancer 9, 463-475 (2009)、Amin et al. Semin Cell Dev Biol 21, 944-950 (2010))。ERBB3 増幅および / または過剰発現は、いくつかの癌において知られているが、ERBB3 体細胞変異の散発的発生のみが報告されており、これらの変異の機能的関連は研究されていない。本明細書に提供される発明は、ヒト癌における頻繁な ERBB3 体細胞変異の特定に関する。

【発明の概要】

【0006】

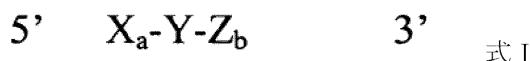
本発明は、胃および結腸腫瘍を含むが、これらに限定されない様々なヒト腫瘍と関連付けられる、受容体チロシンキナーゼ (RTK) のヒト上皮成長因子受容体 (HER) ファミリーの ERBB3 受容体内の複数の体細胞変異事象の発見に少なくとも部分的に基づく。これらの変異は、ヒト腫瘍発生の素因があり、および / または直接寄与すると考えられる。実際に、本明細書に記載されるとおり、変異の一部は腫瘍発生をインピボで促進するという証拠がある。

【0007】

一態様では、本発明は、Erbb3 癌検出薬を提供する。一実施形態では、Erbb3 癌検出薬は、Erbb3 消化管癌検出薬である。別の実施形態では、検出薬は、Erbb3 核酸配列中の Erbb3 変異に特異的に結合することができる試薬を含む。他の一実施形態では、Erbb3 核酸配列は、配列番号 3 または 1 を含む。

【0008】

いくつかの実施形態では、この試薬は、式



のポリヌクレオチドを含み、式中、

X は任意の核酸であり、a は約 0 ~ 約 250 であり、

Y は Erbb3 変異コドンであり、

Z は任意の核酸であり、b は約 0 ~ 約 250 である。

他の一実施形態では、変異コドンが、(i) 104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、および 1164 からなる群から選択される、配列番号 2 の位置のアミノ酸、または (ii) 193 位の終止コドンをコードする。他の一実施形態では、消化管癌は、胃癌

10

20

30

40

50

または結腸癌である。

【0009】

別の態様では、本発明は、対象におけるEr b B 3消化管癌の存在を決定する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中の変異を検出することであって、この変異は、Er b B 3アミノ酸配列の少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、この変異は、対象におけるEr b B 3消化管癌を示す。別の実施形態では、アミノ酸変化を生じる変異は、104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、および193からなる群から選択される、配列番号2の位置にある。他の実施形態では、消化管癌は、胃癌または結腸癌である。

10

【0010】

別の態様では、本発明は、対象におけるEr b B 3癌の存在を決定する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することを含み、この変異は、配列番号2の104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、193、492、および714からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、変異の存在は、対象におけるEr b B 3癌を示す。別の実施形態では、Er b B 3癌は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、非小細胞肺(N S C L C)腺癌、N S C L C(扁平上皮癌)、腎臓腺癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(S C L C)、肝細胞癌(H C C)、肺癌、および肺臓癌からなる群から選択される。

20

【0011】

さらに別の態様では、決定方法は、以下の追加のステップ：治療薬を該対象に投与すること、必要とする対象を特定すること、必要とする対象から試料を得ることのうちの1つ、またはそれらの任意の組み合わせをさらに含む。一実施形態では、治療薬はEr b B阻害剤である。他の実施形態では、このEr b B阻害剤は、EGFR拮抗薬、Er b B 2拮抗薬、Er b B 3拮抗薬、Er b B 4拮抗薬、およびEGFR/Er b B 3拮抗薬からなる群から選択される。別の実施形態では、阻害剤は、低分子阻害剤である。一実施形態では、拮抗薬は、拮抗薬抗体である。さらに別の実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される。

30

【0012】

別の態様では、検出ステップは、増幅または配列決定を含む。一実施形態では、この検出は、変異を増幅させるか、または配列決定することと、変異またはその配列を検出することと、を含む。別の実施形態では、増幅は、増幅プライマーまたは増幅プライマー対を、試料から単離された核酸錠型と混合することを含む。他の実施形態では、プライマーまたはプライマー対は、該変異の近位にあるか、またはそれを含む領域に相補的であるか、または部分的に相補的であり、核酸錠型上でポリメラーゼによる核酸重合を開始することができる。他の一実施形態では、ポリメラーゼおよび核酸錠型を含むDNA重合反応においてプライマーまたはプライマー対を伸長させて増幅産物を生成することをさらに含む。別の実施形態では、増幅または配列決定において、変異は、生体試料から単離されたゲノムDNA中の変異を配列決定すること、変異もしくはその増幅産物をアレイにハイブリダイズすること、変異もしくはその増幅産物を制限酵素で消化すること、または変異のリアルタイムPCR増幅のうちの1つ以上を含むプロセスにより検出される。さらに別の実施形態では、増幅または配列決定は、生体試料から単離された核酸中の変異を部分的または完全に配列決定することをさらに含む。他の実施形態では、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、逆転写酵素PCR(RT-PCR)、またはリガーゼ連鎖反応(LCR)を、PCR、RT-PCR、またはLCRにおける錠型としての生体試料から単離された核酸を用いて行うことを含む。

40

50

【 0 0 1 3 】

他の一態様では、本発明は、必要とする対象における消化管癌を治療する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、a) 対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中の変異を検出することを含み、この変異は、Er b B 3アミノ酸配列の少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、この変異は、Er b B 3消化管癌を示す。別の実施形態では、この方法は、b) 治療薬を該対象に投与することをさらに含む。他の実施形態では、アミノ酸変化をもたらす変異は、配列番号2の104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、および193からなる群から選択される位置に存在する。別の実施形態では、消化管癌は、胃癌または結腸癌である。

10

【 0 0 1 4 】

一態様では、本発明は、対象におけるEr b B 3癌を治療する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、a) 対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することを含み、この変異は、配列番号2の104、809、232、262、284、325、846、928、60、111、135、295、406、453、498、1089、1164、193、492、および714からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、変異の存在は、対象におけるEr b B 3癌を示す。別の実施形態では、この方法は、b) 治療薬を該対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、Er b B 3癌は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、非小細胞肺(NSCLC)腺癌、NSCLC(扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、肝細胞癌(HCC)、肺癌、および膵臓癌からなる群から選択される。

20

【 0 0 1 5 】

別の態様では、治療方法は、Er b B 3阻害剤を必要とする。1つの追加の実施形態では、治療薬は、Er b B 阻害剤である。別の実施形態では、このEr b B 阻害剤は、EGFR拮抗薬、Er b B 2拮抗薬、Er b B 3拮抗薬、Er b B 4拮抗薬、およびEGFR/Er b B 3拮抗薬からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、拮抗薬は、低分子阻害剤である。一実施形態では、拮抗薬は、拮抗薬抗体である。他の実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される。

30

【 0 0 1 6 】**追加の実施形態**

一態様では、本発明は、必要とする対象におけるEr b B 3癌の存在を決定する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出するステップを含み、この変異は、M60、R193、A232、P262、V295、G325、M406、D492、V714、Q809、R1089、T1164からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらす。別の実施形態では、この方法は、治療薬を対象に投与することをさらに含む。他の一実施形態では、この方法は、必要とする対象を特定することをさらに含む。さらに別の実施形態では、この方法は、必要とする対象から試料を得ることをさらに含む。一実施形態では、Er b B 3癌は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、非小細胞肺(NSCLC)腺癌、NSCLC(扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、肝細胞癌(HCC)、肺癌、および膵臓癌からなる群から選択される。

40

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中の変異を検出することを含む、必要とする対象におけるEr b B 3消化管癌の存在を決定する方法を提供し、この変異は、V104、Y111、A232、P262、G284、T389、およびQ809からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらす。別の実施形態では、この方法は、治療薬を対象に投与すること

50

をさらに含む。他の一実施形態では、この方法は、必要とする対象を特定することをさらに含む。さらに別の実施形態では、この方法は、必要とする対象から試料を得ることをさらに含む。他の一実施形態では、ErbB3消化管癌は、胃癌または結腸癌である。

【0018】

他の一態様では、本発明は、必要とする対象における、ErbB拮抗薬に応答する可能性のあるErbB3消化管癌を特定する方法を提供し、該方法は、対象から得られる消化管癌細胞においてErbB3をコードする核酸配列中の変異を検出することを含み、この変異は、V104、Y111、A232、P262、G284、T389、およびQ809からなる群から選択される少なくとも1つの位置に存在する。別の実施形態では、この方法は、治療薬を対象に投与することをさらに含む。他の一実施形態では、この方法は、必要とする対象から試料を得ることをさらに含む。他の一実施形態では、ErbB3消化管癌は、胃癌または結腸癌である。

10

【0019】

別の態様では、本発明は、必要とする対象におけるErbB3癌を治療する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、対象から得られる生体試料においてErbB3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出するステップを含み、この変異は、M60、R193、A232、P262、V295、G325、M406、D492、V714、Q809、R1089、T1164からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらす。別の実施形態では、この方法は、治療薬を該対象に投与するステップをさらに含む。

20

【0020】

別の態様では、本発明は、必要とする対象におけるErbB3消化管癌を治療する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、対象から得られる生体試料においてErbB3をコードする核酸配列中の変異を検出するステップを含み、この変異は、V104、Y111、A232、P262、G284、T389、およびQ809からなる群から選択される少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらす。別の実施形態では、この方法は、治療薬を該対象に投与するステップをさらに含む。

20

【0021】

一実施形態では、本発明の方法において投与される治療薬は、ErbB阻害剤である。別の実施形態では、このErbB阻害剤は、EGFR拮抗薬、ErbB2拮抗薬、ErbB3拮抗薬、ErbB4拮抗薬、およびEGFR/ErbB3拮抗薬からなる群から選択される。他の一実施形態では、阻害剤は、低分子阻害剤である。いくつかの実施形態では、ErbB阻害剤は、EGFR拮抗薬である。他の実施形態では、ErbB阻害剤は、ErbB2拮抗薬である。他の一実施形態では、ErbB阻害剤は、ErbB3拮抗薬である。別の一実施形態では、ErbB阻害剤は、ErbB4拮抗薬である。いくつかの実施形態では、ErbB阻害剤は、EGFR/ErbB3拮抗薬である。他の実施形態では、拮抗薬は、拮抗薬抗体である。いくつかの実施形態では、この抗体は、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、および抗体断片からなる群から選択される。

30

【0022】

別の態様では、本発明の方法は、試料から得られる核酸配列が、変異（複数可）の存在または不在について分析される検出ステップを含む。一実施形態では、この検出は、変異を増幅させるか、または配列決定することと、変異またはその配列を検出することと、を含む。別の実施形態では、増幅は、増幅プライマーまたは増幅プライマー対を、試料から単離された核酸錠型と混合することを含む。他の一実施形態では、プライマーまたはプライマー対は、該変異の近位にあるか、またはそれを含む領域に相補的であるか、または部分的に相補的であり、核酸錠型上でポリメラーゼによる核酸重合を開始することができる。さらに別の実施形態では、この方法は、ポリメラーゼおよび核酸錠型を含むDNA重合反応においてプライマーまたはプライマー対を伸長させて増幅産物を生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、この変異が、生体試料から単離されたゲノムDNA中

40

50

の変異を配列決定すること、変異もしくはその増幅産物をアレイにハイブリダイズすること、変異もしくはその増幅産物を制限酵素で消化すること、または変異のリアルタイムPCR増幅のうちの1つ以上を含むプロセスにより検出される。他の実施形態では、この方法は、生体試料から単離された核酸中の変異を部分的または完全に配列決定することをさらに含む。一実施形態では、増幅は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写酵素PCR（RT-PCR）、またはリガーゼ連鎖反応（LCR）を、PCR、RT-PCR、またはLCRにおける錆型としての生体試料から単離された核酸を用いて行うことを含む。

【図面の簡単な説明】

【0023】

この特許の出願は、色付けされた少なくとも1つの図面を含む。この特許の複製は、色図面（複数可）と共に、必要に応じて必要な料金の支払い時に特許商標庁により提供される。

【0024】

【図1A】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1B】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1C】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1D】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1E】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1F】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1G】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1H】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1I】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1J】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1K】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1L】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図1M】試料。ヒト癌におけるERBB3の研究に使用されるヒト組織試料の一覧を提供する。

【図2A】代表的な野生型ERBB3核酸配列（受入番号NM_001982）（配列番号1）。

【図2B】代表的な野生型ERBB3核酸配列（受入番号NM_001982）（配列番号1）。

【図3】代表的な野生型ERBB3核酸配列（受入番号NP_001973）（配列番号2）。

【図4a】ERBB3体細胞変異。（a～b）ERBB3タンパク質ドメイン上でマップされるERBB3体細胞変異から生じるタンパク質変化を示す。薄赤色の背景で反復するアミノ酸変化として描かれる多発点変異。変異残基の周りの背景縦線の高さは、その特定の位置における変異の頻度に比例する。

【図4b】ERBB3体細胞変異。（a～b）ERBB3タンパク質ドメイン上でマップ

10

20

30

40

50

されるE R B B 3 体細胞変異から生じるタンパク質変化を示す。薄赤色の背景で反復するアミノ酸変化として描かれる多発点変異。変異残基の周りの背景縦線の高さは、その特定の位置における変異の頻度に比例する。

【図4c】E R B B 3 体細胞変異。(c ~ d) E R B B 3 タンパク質ドメイン上に描かれるE R B B 3 非同義的体細胞変異(逆三角形、赤色の三角形は多発点を描く)。上のヒストグラムは、本研究および他の公表された研究において、試料において観測された、各検出位置での変異の数を表す(赤色の棒は、多発点変異を示し、青色の棒は、活性について試験した追加の非多発点変異を示す)。

【図4d】E R B B 3 体細胞変異。(c ~ d) E R B B 3 タンパク質ドメイン上に描かれるE R B B 3 非同義的体細胞変異(逆三角形、赤色の三角形は多発点を描く)。上のヒストグラムは、本研究および他の公表された研究において、試料において観測された、各検出位置での変異の数を表す(赤色の棒は、多発点変異を示し、青色の棒は、活性について試験した追加の非多発点変異を示す)。

【図4e】E R B B 3 体細胞変異。(e ~ f) 図4(a ~ b)の拡大および補足図。図4(a ~ f)は、E r b B 3 の線形図を提供し、図4a、c、およびeは、N末端の半分を示し、図4b、d、およびfは、C末端の半分を示す。

【図4f】E R B B 3 体細胞変異。(e ~ f) 図4(a ~ b)の拡大および補足図。図4(a ~ f)は、E r b B 3 の線形図を提供し、図4a、c、およびeは、N末端の半分を示し、図4b、d、およびfは、C末端の半分を示す。

【図5】R N A配列データを用いて評価される、E R B B 3 変異結腸試料におけるE R B B 3 変異(A、B)の発現およびE R B B 2 (B)の発現(Seshagiri, S. et al. Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (Manuscript in Preparation 2011))。

【図6】変異部位に渡る保護を描く、複数の配列アラインメントE R B B 3 相同分子種。人類(H. sapiens)(NP_001973.2(完全長配列は、配列番号126として開示され、様々な領域は、出現する順にそれぞれ配列番号132~151として開示される))、チンパンジー(P. troglodytes)(XP_509131.2(完全長配列は、配列番号130として開示され、様々な領域は、出現する順にそれぞれ配列番号212~229として開示される))、ハイイロオオカミ(C. lupus)(XP_538226.2(配列番号131))、ウシ(B. taurus)(NP_001096575.1(完全長配列は、配列番号129として開示され、様々な領域は、出現する順にそれぞれ配列番号192~211として開示される))、ハツカネズミ(M. musculus)(NP_034283.1(完全長配列は、配列番号127として開示され、様々な領域は、出現する順にそれぞれ配列番号152~171として開示される))、およびラット(R. norvegicus)(NP_058914.2(完全長配列は、配列番号128として開示され、様々な領域は、出現する順にそれぞれ配列番号172~191として開示される))を、Clustal Wを用いて整列させた(Larkin, M. A. et al. Bioinformatics (Oxford, England) 23, 2947~2948 (2007))。変異残基は、赤色の楕円背景で示される。

【図7】E R B B 3 [p d b 1 M 6 B] およびE R B B 2 [p d b 1 N 8 Z] を使用して、(A)「繫留」E R B B 3 E C D [p d b 1 M 6 B] (B)の結晶構造、または(B)E G F R E C D二量体(p d b 1 I V O)に基づく「非繫留」E R B B 3 /E R B B 2 E C Dヘテロ二量体のモデル上にマップされる、赤色で示される頻繁な(または多発点)体細胞E C D変異。E G F [p d b 1 I V O] (C)に基づいて、灰色表面として示されるE R B B 3 リガンド。E R B B 3 キナーゼドメイン[p d b 3 L M G]の構造上にマップされる、赤色で示されるE R B B 3 キナーゼドメイン体細胞変異。*=終止コドン

【図8】ドメイン別に色付けされたERBB3 (pdb 1M6B) のECD結晶構造上にマップされる、ERBB3体細胞変異。

【図9】ERBB3変異は、3D培地におけるMCF10A細胞のEGF非依存性増殖を支援する。単独またはEGFRもしくはERBB2のいずれかと一緒にERBB3変異体を安定的に発現するMCF10A細胞は、EGF非依存性増殖を示す。MCF10Aを必要とする研究は、血清、EGF、およびNRG1の不在下で行った。EV-空ベクター。

【図10】ERBB3変異体は、EGFおよび血清非依存性の足場非依存性増殖を促進する。単独またはEGFRもしくはERBB2との組み合わせのいずれかで、ERBB3を発現するMCF10Aにより形成されるコロニーを描く代表的画像が示される(a)。(a)に描かれるアッセイからのコロニーの定量は、ERBB3変異体についてEGFR(b)またはERBB2(c)との組み合わせで示される。

【図11】単独(A)またはEGFR(B)もしくはERBB2(C)のいずれかと一緒にERBB3変異体を安定的に発現するMCF10A細胞は、ウェスタンプロットにより評価されるとおり、下流シグナル伝達の上昇を示す。MCF10Aを必要とする研究は、血清、EGF、およびNRG1の不在下で行った。EV-空ベクター。

【図12】ERBB3変異は、3D培地におけるMCF10A細胞のEGF非依存性増殖を支援する。単独またはEGFRもしくはERBB2のいずれかと一緒にERBB3変異体を安定的に発現するMCF10A細胞は、ERBB3/ERBB2を発現するMCF10A細胞と比較して、大きな腺房構造、Ki67染色の増加、および移行指數の増加を示す。データは、3つの独立した実験の平均±標準誤差を表す。MCF10Aを必要とする研究は、血清、EGF、およびNRG1の不在下で行った。EV-空ベクター。

【図13A(a)】移動アッセイにおけるトランスウェルからの移動(a)、およびこの移動効果の定量(b)に続いて、ERBB2と共に表示のERBB3変異体を発現するMCF10A細胞の代表的な画像を示す。

【図13A(b)】移動アッセイにおけるトランスウェルからの移動(a)、およびこの移動効果の定量(b)に続いて、ERBB2と共に表示のERBB3変異体を発現するMCF10A細胞の代表的な画像を示す。

【図13B(a)】ERBB3変異体が、IMCEコロニー上皮細胞の足場非依存性増殖を支援することを示す。ERBB3自体またはERBB2との組み合わせのいずれかで発現するIMCEコロニー上皮細胞は、ERBB3-WT/ERBB2を発現するIMCE細胞と比較して、足場非依存性増殖(a)、増加したコロニー数(b)、上昇したリン酸シグナル伝達(c、d)、およびインビオ増殖(e)を示した。EV-空ベクター。

【図13B(b)】ERBB3変異体が、IMCEコロニー上皮細胞の足場非依存性増殖を支援することを示す。ERBB3自体またはERBB2との組み合わせのいずれかで発現するIMCEコロニー上皮細胞は、ERBB3-WT/ERBB2を発現するIMCE細胞と比較して、足場非依存性増殖(a)、増加したコロニー数(b)、上昇したリン酸シグナル伝達(c、d)、およびインビオ増殖(e)を示した。EV-空ベクター。

【図13B(c-d)】ERBB3変異体が、IMCEコロニー上皮細胞の足場非依存性増殖を支援することを示す。ERBB3自体またはERBB2との組み合わせのいずれかで発現するIMCEコロニー上皮細胞は、ERBB3-WT/ERBB2を発現するIMCE細胞と比較して、足場非依存性増殖(a)、増加したコロニー数(b)、上昇したリン酸シグナル伝達(c、d)、およびインビオ増殖(e)を示した。EV-空ベクター。

【図13B(e)】ERBB3変異体が、IMCEコロニー上皮細胞の足場非依存性増殖を支援することを示す。ERBB3自体またはERBB2との組み合わせのいずれかで発現するIMCEコロニー上皮細胞は、ERBB3-WT/ERBB2を発現するIMCE細胞と比較して、足場非依存性増殖(a)、増加したコロニー数(b)、上昇したリン酸シグナル伝達(c、d)、およびインビオ増殖(e)を示した。EV-空ベクター。

【図14】ERBB3変異体は、形質転換し、BaF3細胞のIL3非依存性生存を促進する。単独またはEGFRもしくはERBB2のいずれかと一緒にERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞は、IL3非依存性生存を促進する。BaF3研究は、IL

10

20

30

40

50

- 3 および NRG 1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 15】ERBB3 変異体は、形質転換し、BaF3 細胞の IL-3 非依存性生存を促進する。単独 (A) または EGFR (B) もしくは ERBB2 (C) のいずれかと一緒に ERBB3 変異体を安定的に発現する BaF3 細胞は、ERBB3 およびその下流エフェクターのリン酸化の増加を促進する。BaF3 研究は、IL-3 および NRG1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 16】単独または EGFR もしくは ERBB2 との組み合わせのいずれかで、ERBB3 変異体を安定的に発現する BaF3 細胞の足場非依存性増殖の代表的画像。BaF3 研究は、IL-3 および NRG1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。 10

【図 17】抗 NRG1、NRG1 中和抗体は、ERBB2 と共に発現した ERBB3 変異体により促進される BaF3 細胞の IL-3 非依存性生存に影響を及ぼさない。BaF3 研究は、IL-3 および NRG1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 18】BS3 を使用して細胞表面タンパク質を架橋することに続いて誘導された免疫沈降材料において観測されるとおり、NRG1 の不在下で、BaF3 細胞における ERBB3 変異体 / ERBB2 へテロ二量体の上昇レベル。BaF3 研究は、IL-3 および NRG1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 19】近接結紮アッセイ 40 を使用して検出される細胞表面上で観測されるとおり、NRG1 の不在下で、BaF3 細胞における ERBB3 変異体 / ERBB2 へテロ二量体の上昇レベル。BaF3 研究は、IL-3 および NRG1 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。 20

【図 20】ERBB3 - ERBB2 へテロ二量体の定量化。近接結紮アッセイからの画像 (図 17) を、Duolink 画像ソフトウェアツール (Uppsala, Sweden) を使用して分析した。ERBB3 および ERBB2 を発現する細胞の表示の組み合わせについて、5 ~ 6 個の画像フィールドの少なくとも 100 個の細胞を、ERBB2 / ERBB3 二量体から生じるシグナル (赤色の点) を分析した。このアッセイは、FLAG (ERBB3) および gD (ERBB2) 抗体 (A) または天然の ERBB3 および ERBB3 抗体 (B) を用いて行った。データは、平均 ± 標準誤差として示される。図 20C は、NRG1 が、ERBB3 - WT または変異体を単独で発現する BaF3 細胞の生存を支援できなかったことを示す。 30

【図 21】ERBB3 ECD 変異体は、異なる用量の外因性リガンド NRG1 に応答して、増加した IL-3 非依存性 BaF3 生存を示す。BaF3 研究は、IL-3 の不在下で行った。EV = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 22】ERBB3 変異体は、腫瘍発生を促進し、全体生存の低下につながる。表示の ERBB3 変異体 / ERBB2 の組み合わせを発現する BaF3 細胞を埋め込んだマウス群のカプランマイヤー生存曲線は、対照 BaF3 (ベクター) 細胞と比較して、全体生存の低下を示す (アームの場合 n = 10、ログランク検定 p < 0.0001)。 40

【図 23】様々な ERBB3 変異体 / ERBB2 - WT を発現する GFP 標識された BaF3 細胞を受けるマウスから単離された総骨髄細胞 (A) および脾臓細胞 (B) のフローサイトメトリー分析。

【図 24】表示の研究アームのマウス (n = 3) の骨髄 (A) および脾臓 (B) における GFP 陽性細胞の平均数が示される。

【図 25】表示の研究アームのマウス (n = 3) からの脾臓 (A) および肝臓 (B) の平均重量が示される。

【図 26】図 21 において分析された同一のマウスからの代表的な H & E 染色された骨髄 (上)、脾臓 (中)、および肝臓 (下) 部分。空ベクター動物からの骨髄は、正常な造血細胞からなる。* = 腫瘍浸潤細胞、R = 赤脾臓、W = 白脾臓のリンパ濾胞。無標の脾臓部分において、腫瘍浸潤細胞による破壊に起因する赤 / 白脾臓構造の喪失がある。スケール 50

バーは、100 μmに対応する。

【図27】ERBB3変異体を発現するBaF3細胞を移植したマウスからの脾臓および肝臓の代表的画像を示す。

【図28】ERBB3変異体の発癌活性に対する抗ERBB抗体および低分子阻害剤の有効性。図面に示されるとおり、ERBB2と一緒にERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞のIL-3非依存性増殖に対する標的治療の影響。

【図29】図面に示されるとおり、ERBB2と一緒にERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞の足場非依存性増殖に対する標的治療の影響の代表的画像。

【図30】本研究において試験したERBB受容体および様々な標的薬剤を示す概略図。

【図31】抗ERBB3抗体は、ERBB3変異体をインピボで効果的に標的する。ERBB2との組み合わせで、ERBB3変異体G284R(A)またはQ809R(B)を発現するBaF3細胞により誘導される白血病様疾患を遮断することにおいて、10mg/kg QWトラスツズマブ(Tmab)、50mg/kg QW抗ERBB3.1、および100mg/kg QW抗ERBB3.2抗体の有効性。対照抗体治療群(対照Ab)は、40mg/kg QW抗ブタクサ抗体を受ける。

【図32】図面に示されるとおり、ERBB2と一緒にERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞の標的治療の影響。治療に使用される抗体および低分子阻害剤の濃度は、図27に示されるものと同一である。

【図33】治療後8時間のBaF3におけるERBB3および下流シグナル伝達分子のリン酸化に対するERBB抗体および低分子阻害剤の影響を示す。24時間でのこれらの同一薬剤の影響は、図30に示される。

【図34】図面に示されるとおり、抗体による治療に続いて、骨髄(BM)および脾臓において変異体ERBB3、G284R(A)、およびQ809R(B)を発現する浸潤BaF3細胞の比率。

【図35】示されるとおり、抗体による治療に続いて、ERBB3変異体細胞、G284R(A)、およびQ809R(B)を埋め込まれた動物からの肝臓および脾臓重量。

【図36】これらの細胞を埋め込まれたマウスの脾臓および骨髄から単離されたERBB3変異体を発現する浸潤GFP陽性BaF3細胞を示す。

【図37(A)】ERBB3変異体は、形質転換し、BaF3細胞のIL3非依存性生存を促進する。(A)単独またはERBB2もしくはERBB2-KDと一緒にERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞のIL3非依存性生存。

【図37(B-C)】ERBB3変異体は、形質転換し、BaF3細胞のIL3非依存性生存を促進する。(B)単独またはERBB2もしくはERBB2-KDとの組み合わせのいずれかで、ERBB3変異体を安定的に発現するBaF3細胞の足場非依存性増殖の代表的画像。(C)(B)に示されるERBB2と共に、ERBB3変異体を発現するBaF3細胞により形成されるコロニーの数を示す棒グラフ。単独またはERBB2-KDとの組み合わせで、ERBB3変異体を発現する細胞により形成されるコロニーはほとんどなかった。

【図37(D-F)】ERBB3変異体は、形質転換し、BaF3細胞のIL3非依存性生存を促進する。(D-F)単独(D)またはERBB2(E)もしくはERBB2-KD(F)との組み合わせのいずれかで、ERBB3変異体を発現するBaF3細胞のpERBB3、pERBB2、pAKT、およびpERK状態を示す、ウェスタンプロット。

【図37(G-H)】ERBB3変異体は、形質転換し、BaF3細胞のIL3非依存性生存を促進する。(G)抗NRG1、NRG1中和抗体は、ERBB2と共に発現したERBB3変異体により促進されるBaF3細胞のIL-3非依存性生存に影響を及ぼさない。(H)ERBB3 ECD変異体は、漸増用量の外因性NRG1に応答して、増加したIL-3非依存性BaF3生存を示す。BaF3研究は、IL-3(A-H)およびNRG1(A-F)の不在下で行った。EV=空ベクター、M=モノマー、およびD=二量体。

【図38(A-D)】shRNA媒介性ERBB3ノックダウンは、腫瘍増殖を遅延させ

10

20

30

40

50

る。(A～J) D O X 誘導時に s h R N A を標的とする誘導 E R B B 3 を安定的に発現する C W - 2 および D V - 9 0 は、非誘導細胞 (A～F) または s h R N A を標的とするルシフェラーゼを発現する細胞 (A～F, G および I) と比較して、低レベルの E R B B 3 および p E R K (A, B)、足場非依存性増殖 (C～F)、および低減したインビボ増殖 (H, J) を示した。(E, F) におけるデータは、(C, D) に示されるものと同様の画像の複数ファイルから定量化される、形成された足場非依存性コロニーの数を表す。データは、平均 ± 標準誤差として示される。

【図 3 8 (E - H)】s h R N A 媒介性 E R B B 3 ノックダウンは、腫瘍増殖を遅延させる。(A～J) D O X 誘導時に s h R N A を標的とする誘導 E R B B 3 を安定的に発現する C W - 2 および D V - 9 0 は、非誘導細胞 (A～F) または s h R N A を標的とするルシフェラーゼを発現する細胞 (A～F, G および I) と比較して、低レベルの E R B B 3 および p E R K (A, B)、足場非依存性増殖 (C～F)、および低減したインビボ増殖 (H, J) を示した。(E, F) におけるデータは、(C, D) に示されるものと同様の画像の複数ファイルから定量化される、形成された足場非依存性コロニーの数を表す。データは、平均 ± 標準誤差として示される。

【図 3 8 (I - J)】s h R N A 媒介性 E R B B 3 ノックダウンは、腫瘍増殖を遅延させる。(A～J) D O X 誘導時に s h R N A を標的とする誘導 E R B B 3 を安定的に発現する C W - 2 および D V - 9 0 は、非誘導細胞 (A～F) または s h R N A を標的とするルシフェラーゼを発現する細胞 (A～F, G および I) と比較して、低レベルの E R B B 3 および p E R K (A, B)、足場非依存性増殖 (C～F)、および低減したインビボ増殖 (H, J) を示した。(E, F) におけるデータは、(C, D) に示されるものと同様の画像の複数ファイルから定量化される、形成された足場非依存性コロニーの数を表す。データは、平均 ± 標準誤差として示される。

【図 3 9 - 1】E r b B 3 の核酸配列 (配列番号 3) およびアミノ酸配列 (配列番号 2) を提供する。本発明の変異は、枠で囲まれたアミノ酸および枠で囲まれた / 下線の付いたコドンにより示される。

【図 3 9 - 2】E r b B 3 の核酸配列 (配列番号 3) およびアミノ酸配列 (配列番号 2) を提供する。本発明の変異は、枠で囲まれたアミノ酸および枠で囲まれた / 下線の付いたコドンにより示される。

【図 3 9 - 3】E r b B 3 の核酸配列 (配列番号 3) およびアミノ酸配列 (配列番号 2) を提供する。本発明の変異は、枠で囲まれたアミノ酸および枠で囲まれた / 下線の付いたコドンにより示される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 5】

本発明の実施は、別段の指示がない限り、分子生物学 (組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、および生化学の従来技術を用い、これらは当該技術分野の技術の範囲内である。そのような技術は、“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, 2nd edition (Sambrook et al., 1989)、“Oligonucleotide Synthesis” (M. J. Gait, et al., 1984)、“Animal Cell Culture” (R. I. Freshney, et al., 1987)、“Methods in Enzymology” (Academic Press, Inc.)、“Handbook of Experimental Immunology”, 4th edition (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987)、“Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987)、“Current Protocols in Molecular Biology” (F. M. Ausubel et al., eds., 1987)、および“PCR: The Polymerase Chain Reaction” (Mullis et al., eds., 1994) 等の文献において完全に説明されてい

10

20

30

40

50

る。

【0026】

定義

別段に定義されない限り、本明細書に使用される全ての技術、表記、および他の科学用語は、本発明が属する当該技術分野の当業者によって広く理解される意味を有する。場合によっては、一般に理解される意味を持つ用語は、明確にするため、および／または即時参照のために本明細書において定義され、本明細書におけるそのような定義の包含は、必ずしも当該技術分野において概して理解されるものを越える実質的な差を表すと解釈されるべきではない。本明細書において説明または参照される技術および手技は、概して、当業者により十分に理解され、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. に記載される分子クローニング方法等の従来の方法論を使用して一般に用いられる。必要に応じて、市販のキットおよび試薬の使用を必要とする手技は、概して、別段の記載がない限り、製造者が定義したプロトコルおよび／またはパラメータに従って実行される。したがって本方法、キット、および使用を説明する前に、本発明が、記載される特定の方法論、プロトコル、細胞株、動物種または属、構成、および試薬に限定されず、それらは当然のことながら異なり得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、本発明の範囲が添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、限定するよう意図されないことも理解されたい。1020

【0027】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される単数形「a」、「and」、および「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数指示対象を含むことに留意すべきである。

【0028】

本明細書および請求項全体で、「含む (comprise)」という用語または「comprises」または「comprising」等の変型は、述べられた整数または整数の群の包含を暗示するが、任意の他の整数または整数の群の除外を暗示しないことが理解されるであろう。30

【0029】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、本明細書において同義的に使用する際、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、および／またはそれらの類似体、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによりポリマーに組み込まれ得る任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそれらの類似体等の修飾ヌクレオチドを含み得る。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組立て前または後に付与され得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド構成成分によって妨害され得る。ポリヌクレオチドは、例えば、標識構成成分との共役によって重合後にさらに修飾され得る。他のタイプの修飾として、例えば、「キャップ」、天然に存在するヌクレオチドのうちの1つ以上の類似体との置換、例えば、非荷電性連結を持つもの（例えば、メチルリン酸塩、ホスホトリエステル、ホスホアミド酸塩、カルバミン酸塩等）、および荷電性連結を持つもの（例えば、ホスホチオエート、ホスホロジチオエート）等のヌクレオチド間修飾、例えば、タンパク質（例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン等）のペンドント部分を含むもの、挿入剤を持つもの（例えば、アクリジン、ソラレン等）、キレート化剤を含むもの（例えば、金属、放射活性金属、ホウ素、酸化金属等）、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を持つもの（例えば、アノマー核酸等）、ならびに非修飾形態のポリヌクレオチド（複数可）が挙げられる。さらに、通常は糖に存在するヒドロキシリ基のいずれかは、例えば、ホスホン酸基、リン酸基と置き換えられ得るか、標準保護基4050

により保護され得るか、もしくは追加のヌクレオチドへの追加の連結を調製するように活性化され得るか、または固体支持体に共役され得る。5'および3'末端OHは、リン酸化されるか、またはアミンもしくは1~20個の炭素原子の有機キャッピング基部分と置換されることができる。他のヒドロキシルは、標準保護基に誘導体化されてもよい。ポリヌクレオチドは、概して当該技術分野において知られている、リボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともでき、例えば、2'-O-メチル-2'-O-アリール、2'-フルオロ-もしくは2'-アジド-リボース、炭素環式糖類似体、-アノマー糖、アラビノース、キシロース、またはリキソース等のエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘプツロース、非環式類似体、およびメチルリボシド等の脱塩基ヌクレオシド類似体を含む。1つ以上のホスホジエステル連結は、代替の連結基により置き換えられ得る。これらの代替連結基としては、限定されないが、リン酸塩は、P(O)S('チオエート')、P(S)S('ジチオエート')、"(O)NR2('アミダート')、P(OR)、P(OR')、COまたはCH2('ホルムアセタール')により置換される実施形態が挙げられ、各RまたはR'は、独立して、Hまたは置換もしくは非置換アルキル(1~20C)であり、任意選択によりエーテル(-O-)連結、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル、もしくはアラルジルを含む。ポリヌクレオチド中の全ての連結が同一である必要はない。前述の説明は、RNAおよびDNAを含む、本明細書において言及される全てのポリヌクレオチドに適用する。

10

【0030】

「オリゴヌクレオチド」は、本明細書において使用する際、少なくとも約7ヌクレオチド長および約250ヌクレオチド長未満の短い一本鎖ポリヌクレオチドを指す。オリゴヌクレオチドは、合成され得る。「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語は、相互排他的ではない。ポリヌクレオチドについての上記の説明は、オリゴヌクレオチドに等しく、完全に適用可能である。

20

【0031】

「プライマー」という用語は、核酸にハイブリダイズし、一般に遊離3'--OH基を提供することによって、相補的核酸の重合化を可能にすることができる、一本鎖ポリヌクレオチドを指す。

【0032】

本明細書で使用する際、「遺伝子」という用語は、その鋳型またはメッセンジャーRNAを介して、特定のペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に特徴的なアミノ酸の配列をコードする、DNA配列を指す。「遺伝子」という用語は、RNA産物をコードするDNA配列も指す。遺伝子という用語は、本明細書においてゲノムDNAを参照して使用する際、介在する非コード領域ならびに調節領域を含み、5'および3'末端を含むことができる。

30

【0033】

「体細胞変異」または「体細胞変化」という用語は、ヌクレオチド配列中の変化(例えば、1つ以上のヌクレオチドの挿入、欠失、変換、または置換)を指し、生殖系細胞とは対照的に、体細胞内で獲得される。この用語は、別段の指示がない限り、ヌクレオチド配列の相補体中の対応する変化も包含する。

40

【0034】

「アミノ酸変化」という用語は、参照配列に対して、アミノ酸配列中の変化(例えば、1つ以上のアミノ酸の挿入、置換、または欠失、例えば、内部欠失またはN-もしくはC-末端切断)を指す。

【0035】

「変化」という用語は、ヌクレオチド変化またはアミノ酸変化のいずれかを指す。

【0036】

「体細胞変異に対応するヌクレオチド位置での遺伝的変化」、「体細胞変異に対応するヌクレオチド位置でのヌクレオチド変化」という用語、およびそれらの文法的变形は、該体細胞変異により占拠される相対対応DNA位置でのポリヌクレオチド配列中のヌクレオ

50

チド変化を指す。この用語は、別段の指示がない限り、ヌクレオチド配列の相補体中の対応する変化も包含する。

【0037】

「アレイ」または「マイクロアレイ」という用語は、基質上のハイブリダイズ可能なアレイ要素、好ましくはポリヌクレオチドプローブ（例えば、オリゴヌクレオチド）の秩序配置を指す。この基質は、ガラススライド等の固体基質、またはニトロセルロース膜等の半固体基質であり得る。

【0038】

「增幅」という用語は、参照核酸配列またはその相補体の1つ以上の複製を生成するプロセスを指す。增幅は、線形または指数関数的であり得る（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR））。「複製」は、必ずしも鑄型配列に対して完全な配列相補性または同一性を意味しない。例えば、複製は、デオキシイノシン等のヌクレオチド類似体、意図的な配列変化（例えば、鑄型に対してハイブリダイズ可能であるが、完全に相補的ではない配列を含むプライマーを介して導入される配列変化）、および／または增幅中に発生する配列エラーを含むことができる。

10

【0039】

「変異特異的オリゴヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド変化を含む標的核酸の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを指す（多くの場合、置換）。「体細胞変異特異的ハイブリダイゼーション」は、変異特異的オリゴヌクレオチドが、その標的核酸に対してハイブリダイズされるとき、変異特異的オリゴヌクレオチド中のヌクレオチドが、ヌクレオチド変化と特異的に塩基対合することを意味する。特定のヌクレオチド変化に対して変異特異的ハイブリダイゼーション可能な体細胞変異特異的オリゴヌクレオチドは、その変化に「特異的」であると言われる。

20

【0040】

「変異特異的プライマー」という用語は、プライマーである変異特異的オリゴヌクレオチドを指す。

【0041】

「プライマー伸長アッセイ」という用語は、ヌクレオチドが核酸に付加され、直接または間接的に検出される、より長い核酸または「伸長産物」をもたらすアッセイを指す。ヌクレオチドを付加して、核酸の5'または3'末端を伸長させることができる。

30

【0042】

「変異特異的ヌクレオチド取り込みアッセイ」という用語は、プライマーが、（a）ヌクレオチド変異の3'または5'である領域での標的核酸にハイブリダイズされ、（b）ポリメラーゼにより伸長され、それによりヌクレオチドに相補的なヌクレオチドを伸長産物の中に取り込む、プライマー伸長アッセイを指す。

【0043】

「変異特異的プライマー伸長アッセイ」という用語は、変異特異的プライマーが、標的核酸にハイブリダイズされて伸長される、プライマー伸長アッセイを指す。

【0044】

「変異特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイ」という用語は、（a）変異特異的オリゴヌクレオチドが、標的核酸にハイブリダイズされ、（b）ハイブリダイゼーションが、直接または間接的に検出される、アッセイを指す。

40

【0045】

「5'ヌクレアーゼアッセイ」という用語は、変異特異的オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションが、ハイブリダイズされたプローブの核酸分解切断を許可し、検出可能なシグナルをもたらす、アッセイを指す。

【0046】

「分子指標を用いるアッセイ」という用語は、変異特異的オリゴヌクレオチドの標的核酸へのハイブリダイゼーションが、遊離オリゴヌクレオチドにより放出される検出可能なシグナルのレベルより高い検出可能なシグナルのレベルをもたらす、アッセイを指す。

50

【0047】

「オリゴヌクレオチド結紮アッセイ」という用語は、変異特異的オリゴヌクレオチドおよび第2のオリゴヌクレオチドが、互いに隣接して標的核酸上でハイブリダイズされ、(介在ヌクレオチドを介して直接または間接的に)一緒に結紮され、結紮産物が、直接または間接的に検出される、アッセイを指す。

【0048】

「標的配列」、「標的核酸」、または「標的核酸配列」という用語は、概して、ヌクレオチド変化が存在することが疑われるか、または知られている、関心のポリヌクレオチド配列を指し、増幅により生成されるそのような標的核酸の複製を含む。

【0049】

「検出」という用語は、直接および間接検出を含む、任意の検出手段を含む。

【0050】

「癌」および「癌性」という用語は、典型的に未制御の細胞増殖により特徴付けられる哺乳類において生理学的状態を指すか、または説明する。本発明により診断される癌は、Erbb3変異の存在により特徴付けられる任意のタイプの癌であり、特に転移性または局所的に進行した切除不可能な癌を含み、制限なしに、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、直腸結腸癌、非小細胞肺(NSCLC)腺癌、NSCLC(扁平上皮癌)、腎臓腺癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、肝細胞癌(HCC)、肺癌、頭頸部癌、および膵臓癌を含む。

【0051】

本明細書で使用する際、癌を発症する「危険性のある」対象は、検出可能な疾患または疾患の症状を有しても有しなくてもよく、本明細書に記載される診断方法の前に、検出可能な疾患または疾患の症状を呈しても呈しなくてもよい。「危険性のある」とは、本明細書に記載され、当業者に既知のとおり、癌の発症に相關する測定可能なパラメータである、1つ以上の危険因子を有することを意味する。これらの危険因子のうちの1つ以上を有する対象は、これらの危険因子(複数可)のうちの1つ以上を有しない対象より癌を発症する可能性が高い。

【0052】

「診断」という用語は、本明細書において、分子または病理状態、疾患、もしくは状態の特定または分類、例えば、癌を指すように使用される。「診断」は、例えば、分子特徴による癌の特定の亜型の分類も指し得る(例えば、特定の遺伝子または核酸領域内のヌクレオチド変異(複数可)により特徴付けられる患者の亜集団)。

【0053】

「診断を補助する」という用語は、本明細書において、癌の特定型の症状または状態の存在または性質に関する臨床決定を支援する方法を指すように使用される。例えば、癌の診断を補助する方法は、癌を示す1つ以上の遺伝子マーカーの存在もしくは不在、または個人からの生体試料において癌を有する危険性の増加を測定することを含み得る。

【0054】

「予後診断」という用語は、本明細書において、癌を発症する可能性の予測を指すように使用される。「予測」という用語は、本明細書において、患者が薬物または一式の薬物に好ましく、または好ましくなく応答する可能性を指すように使用される。一実施形態では、この予測は、それらの応答の程度に関する。一実施形態では、予測は、患者が、治療、例えば、特定の治療薬による治療後に、疾患の再発なしに所定の期間の間生存もしくは改善するか否か、および/またはその可能性に関する。本発明の予測方法を臨床的に用いて、任意の特定患者に最適な治療法を選択することにより治療決定を行うことができる。本発明の予測方法は、患者が、例えば、指定の治療薬または組み合わせの投与、外科的介入、ステロイド治療等を含む指定の治療計画等の治療計画に好ましく応答する可能性があるかどうか、または治療計画後の患者の長期生存が可能であるか否かを予測する際に有益なツールである。

【0055】

10

20

30

40

50

本明細書で使用する際、「治療」は、治療される個人または細胞の自然経過を変更させる試みにおける臨床介入を指し、臨床病理学の経過前または経過中に行うことができる。治療の望ましい効果は、疾患またはその状態もしくは症状の発生もしくは再発を防ぐこと、その疾患の状態または症状を軽減すること、その疾患の任意の直接または間接的病理的帰結を低下させること、疾患の進行速度を減少させること、疾患状態を改善または緩和すること、および寛解または改善した予後を達成することを含む。いくつかの実施形態では、本発明の方法および組成物は、疾患または障害の発達を遅延させる試みにおいて有用である。

【0056】

「癌治療薬」、「癌を治療するために有効な治療薬」、およびそれらの文法的変型は、本明細書において使用する際、有効な量で提供されるとき、癌を有する対象において治療的利益を提供することが知られているか、臨床的に示されているか、または医師により予想される薬剤を指す。一実施形態では、この表現は、有効な量で提供されるとき、癌を有する対象において治療効果を提供することが予想される臨床的に許容されている薬剤として、製造者により市販されているか、または有資格の臨床医により他の方法で使用されている任意の薬剤を含む。様々な非限定的実施形態では、癌治療薬は、化学療法薬、HER二量体化阻害剤、HER抗体、腫瘍関連抗原に対して配向された抗体、抗ホルモン化合物、サイトカイン、EGFR標的薬、抗血管形成剤、チロシンキナーゼ阻害剤、増殖阻害剤および抗体、細胞毒性薬、アポトーシスを誘導する抗体、COX阻害剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、腫瘍胎児性タンパク質CA125を結合する抗体、HER2ワクチン、Rafまたはras阻害剤、リポソームドキソルビシン、トポテカン、タキセン、二重チロシンキナーゼ阻害剤、TLK286、EMD-7200、ペルツズマブ、トラスツズマブ、エルロチニブ、およびベバシズマブを含む。

10

20

30

40

50

【0057】

「化学療法」は、癌の治療において有用な化学化合物の使用である。化学療法において使用される化学療法薬の例として、チオテパおよびCYTOXAN（登録商標）シクロホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、およびピポスルファン等のアルキルスルホン酸塩；ベンゾドーパ、カルボクオン、メツレドーパ、およびウレドーパ等のアジリジン；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミン等のエチレンイミンおよびメチルアメルアミン；TLK286（TELCYTA（商標））；アセトゲニン（特にプラタシンおよびプラタシノン）；-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；-ラパコン；ラパコール；コルチシン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成類似体トポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン、および9-アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エレウテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチイン；スponジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフオスファミド、メクロレタミン、塩酸メクロレタミンオキシド、メルファラン、ノベムビチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスター等のナイトロジエンマスター；カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン等のニトロソウレア；クロドロネート等のビスホスホネート；エネジイン抗生物質（例えば、カリケアミシン、特にカリケアミシンIIおよびカリケアミシンIII等の抗生物質（例えば、Agnew, Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994) 参照）およびアンナマイシン、AD32、アルカルビシン、ダウノルビシン、デクスラゾキサン、DX-52-1、エピルビシン、GPX-100、イ

ダルビシン、KRN5500、メノガリル、ダイネミシン（ダイネミシンAを含む）、エスペラミシン、ネオカルジノスタチン発色団、および関連クロモプロテイン系エンジイン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIMAMYCIN（登録商標）、ドキソルビシン（モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン、リポソームドキソルビシン、およびデオキシドキソルビシンを含む）、エソルビシン、マルセロマイシン、ミトマイシンC等のミトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン（tubercidin）、ウベニメクス、ジノスタチン（zinostatin）、およびゾルビシン（zorubicin）等のアントラサイクリン；デノプテリン（denopterin）、ブテロプテリン（pteropterin）、およびトリメトレキセート（trimetrexate）、等の葉酸類似体；フルダラビン（fuludarabine）、6-メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニン等のプリン類似体、アンシタビン、アザシチジン（azacitidine）、6-アザウリジン（azauridine）、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン（enocitabine）、およびフロキシウリジン（flouxuridine）等のピリミジン類似体；カルステロン（calusterone）、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストラクトン（testolactone）等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、およびトリロスタン等の抗アドレナリ、フォリン酸（ロイコボリン）等の葉酸補液；アセグラトン；ALIMTA（登録商標）等の抗葉酸塩抗新生物薬、LY231514ペメトレキセド、メトレキセート等のジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、5-フルオロウラシル（5-FU）等の抗代謝物、およびUFT、S-1およびカペシタビン等のそのプロドラッグ、およびチミジル酸シンターゼ阻害薬、およびラルチトレキセド等のグリシンアミドリボヌクレオチドホルミルトランスフェラーゼ阻害剤（TOMUDEX^{RM}、TDX）；エニルウラシル等のジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼの阻害剤；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルホルニチン；エリプチニウム酢酸塩；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；レンチナン；ロニダイニン；メイタンシンおよびアンサミトシン等のメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK7ポリサッカリド錯体（JHS Natural Products, Eugene, OR）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2,2',2"-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特に、T-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA、およびアングジン）；ウレタン；ビンデシン（ELDISINE（登録商標）、FILDESIN（登録商標））；デカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン；アラビノシド（"Ara-C"）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイドおよびタキセン（例えば、TAXOL（登録商標）パクリタキセル（Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.）、ABRAXANE（商標）パクリタキセルのクレモホルを含まないアルブミン設計されたナノ粒子製剤（American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois），およびTAXOTERE（登録商標）ドセタキセル（Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France）；クロランブシル；ゲムシタビン（GEMZAR（登録商標））；6-チオグアニン；メルカプトプリン；プラチナ；プラチナ類似体またはシスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン等

のプラチナベースの類似体；ビンプラスチン（V E L B A N（登録商標））；エトポシド（V P - 1 6；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（O N C O V I N（登録商標）；ビンカアルカロイド；ビノレルビン（N A V E L B I N E（登録商標））；ノバントロン；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリン；ゼローダ；イバンドロン酸塩；トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチルオルニチン（D M F O）；レチノイン酸等のレチノイド；上記のうちのいずれかの製薬的に許容される塩、酸、または誘導体；ならびにC H O P（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびプレドニソロンの複合療法の省略形）およびF O L F O X（オキサリプラチニン（E L O X A T I N（商標））と5 - F Uおよびロイコボリンとの組み合わせを用いる治療計画の省略形）が挙げられる。

10

【0058】

「医薬製剤」という用語は、その中に含まれる活性成分の生物活性を有効にすることを許すようにそのような形態を取り、製剤が投与される対象に対して受け入れられないほど毒性である追加の成分を含まない調製物を指す。

【0059】

「製薬的に許容される担体」は、対象に対して非毒性である、活性成分以外の医薬製剤中の成分を指す。製薬的に許容される担体として、緩衝剤、賦形剤、安定剤、または保存剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0060】

「有効な量」は、所望の治療または予防結果を達成するために必要な用量および期間で有効な量を指す。治療薬の「治療上有効な量」は、個人の疾患状態、年齢、性別、および体重等の要因、ならびに抗体が個人において所望の応答を引き出す能力に従って異なり得る。治療上有効な量は、治療上有益な効果が、その治療薬の任意の毒性または悪影響を上回る量である。癌の場合、薬物の治療上有効な量は、癌細胞の数を低減し、腫瘍サイズを低減し、周辺器官への癌細胞の浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅延させ、このましくは停止する）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅延させ、好ましくは停止する）、腫瘍増殖をある程度阻害し、および／または癌と関連付けられる症状のうちの1つ以上をある程度軽減し得る。薬物が増殖を防ぎ、および／または既存の癌細胞を殺傷し得る範囲で、細胞増殖抑制性および／または細胞毒性であり得る。「予防上有効な量」は、所望の予防結果を達成するために必要な用量および期間で有効な量を指す。必ずしもそうではないが典型的に、予防的用量は、疾患に先立って、または早期段階で対象において使用されるため、予防上有効な量は、治療上有効な量未満である。

20

【0061】

「個人」、「対象」、または「患者」は、脊椎動物である。ある実施形態では、脊椎動物は哺乳類である。哺乳類として、靈長類（ヒトおよび非ヒト靈長類を含む）および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、哺乳類はヒトである。

30

【0062】

「患者の亜集団」、およびその文法的変型は、本明細書において使用する際、それが属する広義の疾患カテゴリーにおいて患者のサブセットをその他から区別する、1つ以上の独特的の測定可能および／または特定可能な特徴を有するとして特徴付けられる患者のサブセットを指す。そのような特徴は、疾患のサブカテゴリー、性別、ライフスタイル、健康履歴、関与する臓器／組織、治療履歴等を含む。一実施形態では、患者の亜集団は、特定のヌクレオチド位置および／または領域にヌクレオチド変異（例えば、体細胞変異）を含む、核酸署名により特徴付けられる。

40

【0063】

「対照対象」は、癌を有すると診断されていない、および癌と関連付けられる任意の兆候または症状を患っていない健常な対象を指す。

【0064】

「試料」という用語は、本明細書において使用する際、例えば、身体的、生化学的、化

50

学的、および／または生理学的特徴に基づいて特徴付けられる、および／または特定される、細胞および／または他の分子的実体を含む、関心の対象から得られる、または派生する組成物を指す。例えば、「疾患試料」という表現およびその変型は、特徴付けられる細胞および／または分子的実体を含むことが予想されるか、または知られている関心の対象から得られる任意の試料を指す。

【0065】

「組織または細胞試料」は、対象または患者の組織から得られる類似の細胞の集団を意味する。組織または細胞試料の源は、新鮮な、凍結された、および／または保存された器官もしくは組織試料、または生検または吸引物；血液または任意の血液成分；血清、尿、痰、または唾液等の体液からの固体組織であり得る。組織試料は、一次または培養された細胞または細胞株であってもよい。任意選択により、組織または細胞試料は、疾患組織／器官から得られる。組織試料は、保存剤、抗凝結剤、緩衝剤、固定剤、栄養素、抗生物質等の自然界において組織と自然に混合されない成分を含み得る。「参照試料」、「参照細胞」、「参照組織」、「対照試料」、「対照細胞」、または「対照組織」は、本明細書において使用する際、本発明の方法または組成物を用いて特定する疾患または状態を患っていないことが知られているか、またはそう考えられている源から得られる試料、細胞、または組織を指す。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対象組織は、本発明の組成物または方法を使用して、疾患または状態が特定される同一対象または患者の身体の健常な部分から得られる。一実施形態では、参照試料、参照細胞、参照組織、対照試料、対照細胞、または対象組織は、本発明の組成物または方法を使用して、疾患または状態が特定される対象または患者ではない個人の身体の健常な部分から得られる。

10

20

30

40

【0066】

本明細書における目的で、組織試料の「部分」は、組織試料の単一部分または一片、例えば、組織試料から切断される組織または細胞の薄片を意味する。組織試料の複数区分を採取し、本発明に従って分析にかけてよいことが理解されるが、本発明は、組織試料の同一区分が形態学的および分子的レベルの両方で分析されるか、またはタンパク質および核酸の両方に関して分析される方法を含む。

【0067】

「相関する (correlate)」または「相関している (correlating)」は、任意の方法で、第1の分析またはプロトコルの性能および／または結果を、第2の分析またはプロトコルの性能および／または結果と比較することを意味する。例えば、第2のプロトコルを実行する際に第1の分析またはプロトコルの結果を使用してよく、および／または第2の分析またはプロトコルが行われるべきか否かを決定するために、第1の分析またはプロトコルの結果を使用してもよい。遺伝子発現分析またはプロトコルの実施形態に関して、特定の治療計画が行われるべきか否かを決定するために、遺伝子発現分析またはプロトコルの結果を使用してよい。

【0068】

「低分子」または「有機低分子」は、本明細書において、約500ダルトン以下の分子量を有する有機分子として定義される。

【0069】

「標識」という語は、本明細書において使用されるとき、検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であり得るか（例えば、放射性同位元素標識もしくは蛍光標識）、または酵素標識の場合は、検出可能な産物をもたらす基質化合物もしくは組成物の化学的变化を触媒し得る。検出可能な標識として機能することができる放射性核種として、例えば、I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212、およびPd-109が挙げられる。

【0070】

本明細書における「約」値またはパラメータに関する言及は、その値またはパラメータ

50

自体を対象にする実施形態を含む（および説明する）。例えば、「約X」に関する記述は、「X」に関する記述を含む。

【0071】

「添付文書」という用語は、治療薬の市販のパッケージに習慣的に含まれる、適応、用途、用量、投与、複合療法、禁忌、および／またはそのような治療薬の使用に関する警告に関する情報を含む指示書を指すように使用される。

【0072】

「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、最も広い意味において同義的に使用され、モノクローナル抗体（例えば、完全長または正常なモノクローナル抗体）、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多特異性抗体（例えば、所望の生物活性を呈する限り、二特異性抗体）を含み、（本明細書においてさらに詳述されるとおり）ある抗体断片を含んでもよい。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化、および／または親和性成熟であり得る。「抗体断片」は、正常な抗体の一部分を含み、好ましくは、その抗原結合領域を含む。抗体断片の例として、F_ab、F_ab'、F(a b')₂、およびFv断片；二重特異性抗体；線形抗体；一本鎖抗体分子；および抗体断片から形成される多特異性抗体が挙げられる。

10

【0073】

関心の抗原に「結合する」本発明の抗体は、その抗体が、抗原を発現するタンパク質または細胞もしくは組織を標的する際に診断および／または治療薬として有用であるように十分な親和性を持つ抗原に結合するものである。抗体の標的分子への結合に関して、特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチドまたはエピトープに「特異的結合」または「特異的に結合する」または「特異的である」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、対照分子の結合と比較して、分子の結合を決定することにより測定することができる。例えば、特異的結合は、標的、例えば、過剰な非標識標的に類似する対照分子との競合により決定することができる。この場合、特異的結合は、標識された標的のプローブへの結合が、過剰な非標識標的に競合して阻害される場合に示される。特定の一実施形態では、「特異的に結合する」は、他の特定された非標的HER受容体ではなく、抗体のその特定された標的HER受容体への結合を指す。例えば、抗HER3抗体は、HER3に特異的に結合するが、EGFR、HER2、またはHER4には特異的に結合しない。EGFR/HER3二重特異性抗体は、EGFRおよびHER3に特異的に結合するが、HER2またはHER4には特異的に結合しない。

20

【0074】

「HER受容体」または「Erbb受容体」は、HER受容体ファミリーに属する受容体タンパク質チロシンキナーゼであり、EGFR(ErbB1、HER1)、HER2(ErbB2)、HER3(ErbB3)、およびHER4(ErbB4)受容体を含む。HER受容体は、概して、HERリガンドに結合し、および／または別のHER受容体分子を用いて二量体化し得る、細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；およびホスホリル化され得るいくつかのチロシン残基を内包するカルボキシル末端シグナル伝達ドメインを含む。HER受容体は、「天然配列」HER受容体またはその「アミノ酸配列変異体」であってよい。好ましくは、HER受容体は、天然配列ヒトHER受容体である。「HER経路」は、HER受容体ファミリーにより媒介されるシグナル伝達ネットワークを指す。

30

【0075】

「Erbb1」、「HER1」、「上皮増殖因子受容体」、および「EGFR」という用語は、本明細書において同義的に使用され、例えば、Carpenter et al Ann. Rev. Biochem. 56: 881-914 (1987)において開示されるEGFRを指し、その天然に存在する変異体形態（例えば、Ullrich et al, Nature (1984) 309: 418425およびHumphrey et al. PNAS (USA) 87: 4207-4211 (1900)に記載される欠失変異

40

50

体EGFR)、ならびにEGFRvIII等のその変異体を含む。EGFRの変異体は、欠失、置換、および挿入変異体、例えば、Lynch et al (New England Journal of Medicine 2004, 350: 2129)、Paez et al (Science 2004, 304: 1497)、およびPao et al (PNAS 2004, 101: 13306)に記載されるものも含む。本明細書において、「EGFR細胞外ドメイン」または「EGFR ECD」は、細胞の外側にあり、細胞膜に係留されるか、または循環中のいずれかにあるEGFRのドメインを指し、その断片を含む。一実施形態では、EGFRの細胞外ドメインは、4つのドメイン:「ドメインI」(約1~158のアミノ酸残基)、「ドメインII」(アミノ酸残基159~336)、「ドメインIII」(アミノ酸残基337~470)、および「ドメインIV」(アミノ酸残基471~645)を含んでよく、これらの境界は近接し、約1~3個のアミノ酸だけ異なり得る。
10

【0076】

「erbB2」および「HER2」という表現は、本明細書において同義的に使用され、例えば、Semb et al, PNAS (USA) 82: 6497-6501 (1985) およびYamamoto et al. Nature 319: 230-234 (1986) (GenBank受入番号X03363)に記載されるヒトHER2タンパク質を指す。「er£B2」という用語は、ヒトHER2をコードする遺伝子を指し、「neu」は、ラットp185"eaをコードする遺伝子を指す。好適なHER2は、天然配列ヒトHER2である。
20

【0077】

本明細書において、「HER2細胞外ドメイン」または「HER2 ECD」は、細胞の外側にあり、細胞膜に係留されるか、または循環中のいずれかにあるHER2のドメインを指し、その断片を含む。一実施形態では、HER2の細胞外ドメインは、4つのドメイン:「ドメインI」(約1~195のアミノ酸残基)、「ドメインII」(約196~319のアミノ酸残基)、「ドメインIII」(約320~488のアミノ酸残基)、および「ドメインIV」(約489~630のアミノ酸残基)(シグナルペプチドを含まない残基番号付け)を含んでよい。Garrett et al. Mol. Cell. 11: 495-505 (2003)、Cho et al. Nature 411: 756-760 (2003)、Franklin et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 317-328 (2004)、およびPlowman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 1746-1750 (1993)を参照されたい。
30

【0078】

「erbB3」および「HER3」は、例えば、米国特許第5,183,884号および第5,480,968号、ならびにKraus et al. PNAS (USA) 86: 9193-9197 (1989)に開示される受容体ポリペプチドを指す(図2および3も参照)。

【0079】

本明細書において、「HER3細胞外ドメイン」または「HER3 ECD」、または「erbB3細胞外ドメイン」は、細胞の外側にあり、細胞膜に係留されるか、または循環中のいずれかにあるHER3のドメインを指し、その断片を含む。一実施形態では、HER3の細胞外ドメインは、4つのドメイン:ドメインI、ドメインII、ドメインIII、およびドメインIVを含み得る。一実施形態では、HER3 ECDは、アミノ酸1~636(シグナルペプチドを含む番号付け)を含む。一実施形態では、HER3ドメインIIIは、アミノ酸328~532(シグナルペプチドを含む番号付け)を含む。
40

【0080】

「erbB4」および「HER4」という用語は、本明細書において、例えば、欧洲特許出願第599,274号、Plowman et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 1746-1750 (1993)、およびPlowman

et al, *Nature*, 366; 473 - 475 (1993) に開示される、受容体ポリペプチドを指し、例えば、1999年4月22日に公開された国際特許第WO99/19488号に開示される、そのアイソフォームを含む。「HERリガンド」は、HER受容体に結合し、および/または活性化するポリペプチドを意味する。本明細書における特定の関心のHERリガンドは、上皮増殖因子(EGF)等の天然配列ヒトHERリガンド(Savage et al, *J. Biol. Chem.* 247: 7612 - 7621 (1972))、形質転換増殖因子(TGF-) (Marquardt et al, *Science* 223: 1079 - 1082 (1984))、神経鞘腫またはケラチノサイト自己分泌増殖因子としても知られるアンフィレグリン(Shoyab et al *Science* 243: 1074 - 1076 (1989)、Kimura et al *Nature* 348: 257 - 260 (1990)、およびCook et al *Mol. Cell. Biol.* 11: 2547 - 2557 (1991))、ベタセルリン(Shing et al, *Science* 259: 1604 - 1607 (1993)、およびSasada et al *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 1173 (1993))、ヘパリン結合上皮増殖因子(HB-EGF) (Higashiyama et al, *Science* 251: 936 - 939 (1991))、エピレグリン(Toyoda et al, *J. Biol. Chem.* 270: 7495 - 7500 (1995)、およびKomurasaki et al *Oncogene* 15: 2841 - 2848 (1997))、ヘレグリン(以下参照)、ネウレグリン-2(NRG-2) (Carraway et al, *Nature* 387: 512 - 516 (1997))、ネウレグリン-3(NRG-3) (Zhang et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 9562 - 9567 (1997))、ネウレグリン-4(NRG-4) (Harari et al *Oncogene* 18: 2681 - 89 (1999))、およびクリプト(CR-I) (Kanmm et al. *J. Biol. Chem.* 272 (6): 3330 - 3335 (1997))である。EGFRに結合するHERリガンドとして、EGF、TGF-、アンフィレグリン、ベタセルリン、HB-EGF、およびエピレグリンが挙げられる。HER3に結合するHERリガンドとして、ヘレグリンおよびNRG-2が挙げられる。HER4に結合可能なHERリガンドとして、ベタセルリン、エピレグリン、HB-EGF、NRG-2、NRG-3、NRG-4、およびヘレグリンが挙げられる。

【0081】

「ヘレグリン」(HRG)は、本明細書において使用するとき、米国特許第5,641,869号、またはMarchionni et al, *Nature*, 362: 312 - 318 (1993) に開示される、ヘレグリン遺伝子産物によりコードされるポリペプチドを指す。ヘレグリンの例として、ヘレグリン-、ヘレグリン-1、ヘレグリン-2、およびヘレグリン-3 (Holmes et al, *Science*, 256: 1205 - 1210 (1992)、および米国特許第5,641,869号)、neu分化因子(NDF) (Pele et al *Cell* 69: 205 - 216 (1992)、アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA) (Fall et al. *Cell* 72: 801 - 815 (1993))、グリア増殖因子(GGF) (Marchionni et al., *Nature*, 362: 312 - 318 (1993))、感覚および運動神経由来因子(SMDF) (Ho et al. *J. Biol. Chem.* 270: 14523 - 14532 (1995))、-ヘレグリン(Schaefer et al. *Oncogene* 15: 1385 - 1394 (1997))が挙げられる。本明細書において「HER二量体」は、少なくとも2つのHER受容体を含む非共有結合した二量体である。そのような錯体は、2つ以上のHER受容体を発現する細胞が、HERリガンドに曝露され、免疫沈降により単離され、例えば、Slivkowska et al, *J. Biol. Chem.*, 269 (20): 14661 - 14665 (1994) に記載される、SDS-PAGEにより分析されることがあるときに形成され得る。サイトカイン受容体サブユニット(例えば、gp130)等の他のタンパク質は、二量体と関

連付けられ得る。

【0082】

本明細書において「HERヘテロ二量体」は、少なくとも2つの異なるHER受容体、例えば、EGFR-HER2、EGFR-HER3、EGFR-HER4、HER2-HER3、またはHER2-HER4ヘテロ二量体等を含む非共有結合した二量体である。

【0083】

「HER阻害剤」または「erbB阻害剤」または「erbB拮抗薬」は、HER活性または機能を干渉する薬剤である。HER阻害剤の例として、HER抗体（例えば、EGFR、HER2、HER3、またはHER4抗体）；EGFR標的薬物；低分子HER拮抗薬；HERチロシンキナーゼ阻害剤；HER2およびEGFR二重チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、ラバチニブ/GW572016）；アンチセンス分子（例えば、WO2004/87207参照）；および/またはMAPKもしくはAkt等の下流シグナル伝達分子に結合するか、またはその機能を干渉する薬剤が挙げられる。好ましくは、HER阻害剤は、HER受容体に結合する抗体である。一般に、HER阻害剤は、特定のHER受容体に特異的に結合し、そのシグナル伝達活性を防止または低減するが、他のHER受容体には特異的に結合しない。例えば、HER3拮抗薬は、特異的に結合してその活性を低減するが、EGFR、HER2、またはHER4には特異的に結合しない。

10

【0084】

「HER二量体化阻害剤」または「HDI」は、HERホモ二量体またはHERヘテロ二量体の形成を阻害する薬剤である。好ましくは、HER二量体化阻害剤は抗体である。しかしながら、HER二量体化阻害剤は、ペプチドおよび非ペプチド低分子、ならびにHERホモ二量体またはヘテロ二量体の形成を阻害する他の化学的実体も含む。

20

【0085】

「HER二量体化を阻害する」抗体は、基礎となる機序に関わらず、HER二量体の形成を阻害するか、または干渉する抗体である。一実施形態では、そのような抗体は、そのヘテロ二量体結合部位においてHER2に結合する。抗体を阻害する二量体化の特定の一例は、ペルツズマブ(Pmab)またはMab2C4である。HER二量体化阻害剤の他の例として、EGFRに結合し、1つ以上の他のHER受容体とのその二量体化を阻害する抗体（例えば、活性化または非繫留EGFRに結合するEGFRモノクローナル抗体806、Mab806；例えば、Johns et al, J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384(2004)）；HER4に結合し、1つ以上の他のHER受容体とのその二量体化を阻害する抗体；ペプチド二量体化阻害剤（米国特許第6,417,168号）；アンチセンス二量体阻害剤等が挙げられる。

30

【0086】

本明細書において使用する際、「HER2拮抗薬」または「EGFR阻害剤」は、EGFRに特異的に結合し、そのシグナル伝達活性を予防または低減し、HER2、HER3、またはHER4に特異的に結合しない化合物を指す。そのような薬剤の例として、EGFRに結合する抗体および低分子が挙げられる。EGFRに結合する抗体の例

【0087】

本明細書において使用する際、「EGFR拮抗薬」または「EGFR阻害剤」は、EGFRに特異的に結合し、そのシグナル伝達活性を予防または低減し、HER2、HER3、またはHER4に特異的に結合しない化合物を指す。そのような薬剤の例として、EGFRに結合する抗体および低分子が挙げられる。EGFRに結合する抗体の例として、Mab579(ATCC CRL HB 8506)、Mab455(ATCC CRL HB 8507)、Mab225(ATCC CRL 8508)、Mab528(ATCC CRL 8509)（米国特許第4,943,533号、Mendelsohn et al.参照）、およびキメラ化225(C225またはセツキシマブ；ERBITUX（登録商標）および再形成ヒト225(H225)（WO96/40210、Imclone Systems Inc.参照）；IMC-11F8、完全ヒトEGFR標的抗体（Imclone）；II型変異体EGFRに結合する抗体（米国特許第5,

40

50

212, 290) ; 米国特許第5, 891, 996号に記載されるEGFRに結合するヒト化およびキメラ化抗体；およびABX-EGFまたはパニツムマブ等のEGFRに結合するヒト抗体(WO 98/50433、Abgenix/Amgen参照)；EMD 55900(Stragliotto et al. Eur. J. Cancer 32A: 636-640(1996))；EGFR結合のためにEGFおよびTGF-の両方と競合するEGFRに対して配向されたEMD7200(マツズマブ)ヒト化EGFR抗体(EMD/Merck)；ヒトEGFR抗体、HuMax-EGFR(GenMab)；E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E2.11、E6.3、およびE7.6.3として知られ、米国特許6, 235, 883号に記載される完全ヒト抗体；およびmAb 806またはヒト化mAb 806(Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29): 30375-30384(2004))が挙げられる。抗EGFR抗体は、細胞毒性剤と共有結合され得、したがって免疫抱合体を生成する(例えば、EP 659, 439 A2、Merck Patent GmbH参照)。EGFR拮抗薬として、米国特許第5, 616, 582号、第5, 457, 105号、第5, 475, 001号、第5, 654, 307号、第5, 679, 683号、第6, 084, 095号、第6, 265, 410号、第6, 455, 534号、第6, 521, 620号、第6, 596, 726号、第6, 713, 484号、第5, 770, 599号、第6, 140, 332号、第5, 866, 572号、第6, 399, 602号、第6, 344, 459号、第6, 602, 863号、第6, 391, 874号、第6, 344, 455号、第5, 760, 041号、第6, 002, 008号、および第5, 747, 498号、ならびに以下のPCT公開第WO 98/14451号、第WO 98/50038号、第WO 99/09016号、および第WO 99/24037号に記載の化合物等の低分子を含む。特定の低分子EGFR拮抗薬としては、OSI-774(CP-358774、エルロチニブ、TARCEVA(登録商標)Genentech/OSI Pharmaceuticals)；PD 183805(CI 1033、2-プロペンアミド、N-[4-[(3-クロロ-4-フルオロフェニル)アミノ]-7-[3-(4-モルホリニル)プロポキシ]-6-キナゾリニル]-ジヒドロクロリド、Pfizer Inc.)；ZD 1839、ゲフィチニブ(IRESSA(登録商標)4-(3'-クロロ-4'-フルオロアニリノ)-7-メトキシ-6-(3-モルホリノプロポキシ)キナゾリン、AstraZeneca)；ZM 105180((6-アミノ-4-(3-メチルフェニル-アミノ)-キナゾリン、Zeneca)；BIBX-1382(N 8-3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N 2-(1-メチル-ピペリジン-4-イル)-ピリミド[5, 4-d]ピリミジン-2, 8-ジアミン、Boehringer Ingelheim)；PKI-166((R)-4-[4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-1H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン-6-]-フェノール)；(R)-6-(4-ヒドロキシフェニル)-4-[(1-フェニルエチル)アミノ]-7H-ピロロ[2, 3-d]ピリミジン)；CL-387785(N-[4-[(3-プロモフェニル)アミノ]-6-キナゾリニル]-2-ブチナミド)；EK B-569(N-[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-6-キノリニル]-4-(ジメチルアミノ)-2-ブテンアミド)(Wyeeth)；AG 1478(Sugen)；およびAG 1571(SU5271；Sugen)が挙げられる。

【0088】

「HER抗体」は、HER受容体に結合する抗体である。随意選択により、HER抗体は、HER活性化または機能をさらに干渉する。特定のHER2抗体として、ペルツズマブおよびトラスツズマブが挙げられる。特定のEGFR抗体の例として、セツキシマブおよびパニツムマブが挙げられる。HER抗体に関する特許公開として、US 5, 677, 171、US 5, 720, 937、US 5, 720, 954、US 5, 725, 856、US 5, 770, 195、US 5, 772, 997、US 6, 165, 464、US 6,

3 8 7 , 3 7 1 、 U S 6 , 3 9 9 , 0 6 3 、 U S 2 0 0 2 / 1 9 2 2 1 I A 1 、 U S 6
, 0 1 5 , 5 6 7 、 U S 6 , 3 3 3 , 1 6 9 、 U S 4 , 9 6 8 , 6 0 3 、 U S 5 , 8 2 1
, 3 3 7 、 U S 6 , 0 5 4 , 2 9 7 、 U S 6 , 4 0 7 , 2 1 3 、 U S 6 , 7 1 9 , 9 7 1
、 U S 6 , 8 0 0 , 7 3 8 、 U S 2 0 0 4 / 0 2 3 6 0 7 8 A 1 、 U S 5 , 6 4 8 , 2 3
7 、 U S 6 , 2 6 7 , 9 5 8 、 U S 6 , 6 8 5 , 9 4 0 、 U S 6 , 8 2 1 , 5 1 5 、 W O
9 8 / 1 7 7 9 7 、 U S 6 , 3 3 3 , 3 9 8 、 U S 6 , 7 9 7 , 8 1 4 、 U S 6 , 3 3 9
, 1 4 2 、 U S 6 , 4 1 7 , 3 3 5 、 U S 6 , 4 8 9 , 4 4 7 、 W O 9 9 / 3 1 1 4 0 、
U S 2 0 0 3 / 0 1 4 7 8 8 4 A 1 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 7 0 2 3 4 A 1 、 U S 2 0 0 5
/ 0 0 0 2 9 2 8 A 1 、 U S 6 , 5 7 3 , 0 4 3 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 5 2 9 8 7 A 1 、
W O 9 9 / 4 8 5 2 7 、 U S 2 0 0 2 / 0 1 4 1 9 9 3 A 1 、 W O 0 1 / 0 0 2 4 5 、 U 10
S 2 0 0 3 / 0 0 8 6 9 2 4 、 U S 2 0 0 4 / 0 0 1 3 6 6 7 A 1 、 W O 0 0 / 6 9 4 6
0 、 W O 0 1 / 0 0 2 3 8 、 W O 0 1 / 1 5 7 3 0 、 U S 6 , 6 2 7 , 1 9 6 B 1 、 U S
6 , 6 3 2 , 9 7 9 B 1 、 W O 0 1 / 0 0 2 4 4 、 U S 2 0 0 2 / 0 0 9 0 6 6 2 A 1 、
W O 0 1 / 8 9 5 6 6 、 U S 2 0 0 2 / 0 0 6 4 7 8 5 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 3 4 3 4 4
、 W O 0 4 / 2 4 8 6 6 、 U S 2 0 0 4 / 0 0 8 2 0 4 7 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 7 5 8 4
5 A 1 、 W O 0 3 / 0 8 7 1 3 1 、 U S 2 0 0 3 / 0 2 2 8 6 6 3 、 W O 2 0 0 4 / 0 0
8 0 9 9 A 2 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 0 6 1 6 1 、 W O 2 0 0 4 / 0 4 8 5 2 5 、 U S 2 0
0 4 / 0 2 5 8 6 8 5 A 1 、 U S 5 , 9 8 5 , 5 5 3 、 U S 5 , 7 4 7 , 2 6 1 、 U S 4
, 9 3 5 , 3 4 1 、 U S 5 , 4 0 1 , 6 3 8 、 U S 5 , 6 0 4 , 1 0 7 、 W O 8 7 / 0 7
6 4 6 、 W O 8 9 / 1 0 4 1 2 、 W O 9 1 / 0 5 2 6 4 、 E P 4 1 2 , 1 1 6 B 1 、 E P 20
4 9 4 , 1 3 5 B 1 、 U S 5 , 8 2 4 , 3 1 1 、 E P 4 4 4 , 1 8 1 B 1 、 E P 1 , 0 0
6 , 1 9 4 A 2 、 U S 2 0 0 2 / 0 1 5 5 5 2 7 A 1 、 W O 9 1 / 0 2 0 6 2 、 U S 5 ,
5 7 1 , 8 9 4 、 U S 5 , 9 3 9 , 5 3 1 、 E P 5 0 2 , 8 1 2 B 1 、 W O 9 3 / 0 3 7
4 1 、 E P 5 5 4 , 4 4 1 B 1 、 E P 6 5 6 , 3 6 7 A 1 、 U S 5 , 2 8 8 , 4 7 7
、 U S 5 , 5 1 4 , 5 5 4 、 U S 5 , 5 8 7 , 4 5 8 、 W O 9 3 / 1 2 2 2 0 、 W O 9 3
/ 1 6 1 8 5 、 U S 5 , 8 7 7 , 3 0 5 、 W O 9 3 / 2 1 3 1 9 、 W O 9 3 / 2 1 2 3 2
、 U S 5 , 8 5 6 , 0 8 9 、 W O 9 4 / 2 2 4 7 8 、 U S 5 , 9 1 0 , 4 8 6 、 U S 6 ,
0 2 8 , 0 5 9 、 W O 9 6 / 0 7 3 2 1 、 U S 5 , 8 0 4 , 3 9 6 、 U S 5 , 8 4 6 , 7
4 9 、 E P 7 1 1 , 5 6 5 、 W O 9 6 / 1 6 6 7 3 、 U S 5 , 7 8 3 , 4 0 4 、 U S 5
, 9 7 7 , 3 2 2 、 U S 6 , 5 1 2 , 0 9 7 、 W O 9 7 / 0 0 2 7 1 、 U S 6 , 2 7 0 , 30
7 6 5 、 U S 6 , 3 9 5 , 2 7 2 、 U S 5 , 8 3 7 , 2 4 3 、 W O 9 6 / 4 0 7 8 9 、 U
S 5 , 7 8 3 , 1 8 6 、 U S 6 , 4 5 8 , 3 5 6 、 W O 9 7 / 2 0 8 5 8 、 W O 9 7 / 3
8 7 3 1 、 U S 6 , 2 1 4 , 3 8 8 、 U S 5 , 9 2 5 , 5 1 9 、 W O 9 8 / 0 2 4 6 3 、
U S 5 , 9 2 2 , 8 4 5 、 W O 9 8 / 1 8 4 8 9 、 W O 9 8 / 3 3 9 1 4 、 U S 5 , 9 9
4 , 0 7 1 、 W O 9 8 / 4 5 4 7 9 、 U S 6 , 3 5 8 , 6 8 2 B 1 、 U S 2 0 0 3 / 0 0
5 9 7 9 0 、 W O 9 9 / 5 5 3 6 7 、 W O 0 1 / 2 0 0 3 3 、 U S 2 0 0 2 / 0 0 7 6 6
9 5 A 1 、 W O 0 0 / 7 8 3 4 7 、 W O 0 1 / 0 9 1 8 7 、 W O 0 1 / 2 1 1 9 2 、 W
0 0 1 / 3 2 1 5 5 、 W O 0 1 / 5 3 3 5 4 、 W O 0 1 / 5 6 6 0 4 、 W O 0 1 / 7 6 6
3 0 、 W O 0 2 / 0 5 7 9 1 、 W O 0 2 / 1 1 6 7 7 、 U S 6 , 5 8 2 , 9 1 9 、 U S 2
0 0 2 / 0 1 9 2 6 5 2 A 1 、 U S 2 0 0 3 / 0 2 1 1 5 3 0 A 1 、 W O 0 2 / 4 4 4 1
3 、 U S 2 0 0 2 / 0 1 4 2 3 2 8 、 U S 6 , 6 0 2 , 6 7 0 B 2 、 W O 0 2 / 4 5 6
5 3 、 W O 0 2 / 0 5 5 1 0 6 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 5 2 5 7 2 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 6
5 8 4 0 、 W O 0 2 / 0 8 7 6 1 9 、 W O 0 3 / 0 0 6 5 0 9 、 W O 0 3 / 0 1 2 0 7 2
、 W O 0 3 / 0 2 8 6 3 8 、 U S 2 0 0 3 / 0 0 6 8 3 1 8 、 W O 0 3 / 0 4 1 7 3 6
、 E P 1 , 3 5 7 , 1 3 2 、 U S 2 0 0 3 / 0 2 0 2 9 7 3 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 3 8 1 6
0 、 U S 5 , 7 0 5 , 1 5 7 、 U S 6 , 1 2 3 , 9 3 9 、 E P 6 1 6 , 8 1 2 B 1 、 U
S 2 0 0 3 / 0 1 0 3 9 7 3 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 0 8 5 4 5 、 U S 6 , 4 0 3 , 6 3 0
B 1 、 W O 0 0 / 6 1 1 4 5 、 W O 0 0 / 6 1 1 8 5 、 U S 6 , 3 3 3 , 3 4 8 B 1
、 W O 0 1 / 0 5 4 2 5 、 W O 0 1 / 6 4 2 4 6 、 U S 2 0 0 3 / 0 0 2 2 9 1 8 、 U
2 0 0 2 / 0 0 5 1 7 8 5 A 1 、 U S 6 , 7 6 7 , 5 4 1 、 W O 0 1 / 7 6 5 8 6 、 U 50

S 2 0 0 3 / 0 1 4 4 2 5 2 、 W O 0 1 / 8 7 3 3 6 、 U S 2 0 0 2 / 0 0 3 1 5 3 5
 A 1 、 W O 0 1 / 8 7 3 3 4 、 W O 0 2 / 0 5 7 9 1 、 W O 0 2 / 0 9 7 5 4 、 U S 2 0
 0 3 / 0 1 5 7 0 9 7 、 U S 2 0 0 2 / 0 0 7 6 4 0 8 、 W O 0 2 / 0 5 5 1 0 6 、 W O
 0 2 / 0 7 0 0 0 8 、 W O 0 2 / 0 8 9 8 4 2 、 W O 1 1 / 0 7 6 6 8 3 、 および W O 0
 3 / 8 6 4 6 7 が挙げられる。

【 0 0 8 9 】

「 H E R 活性化 」 は、 任意の 1 つ以上の H E R 受容体の活性化またはリン酸化を指す。 一般に、 H E R 活性化は、 シグナル変換をもたらす（ 例えば、 H E R 受容体または基質ポリペプチド中の H E R 受容体ホスホリル化チロシン残基の細胞内キナーゼドメインにより引き起こされる ）。 H E R 活性化は、 関心の H E R 受容体を含む H E R 二量体に結合する H E R リガンドにより媒介され得る。 H E R 二量体に結合する H E R リガンドは、 二量体中の H E R 受容体のうちの 1 つ以上のキナーゼドメインを活性化し得、 それにより H E R 受容体のうちの 1 つ以上におけるチロシン残基のホスホリル化、 および / または A k t または M A P K 細胞内キナーゼ等の追加の基質ポリペプチド（ 複数可 ）におけるチロシン残基のホスホリル化をもたらす。

【 0 0 9 0 】

「 ホスホリル化 」 は、 1 つ以上のリン酸基（ 複数可 ）の H E R 受容体等のタンパク質、 またはその基質への付加を指す。

【 0 0 9 1 】

H E R 2 上の「 ヘテロ二量体結合部位 」 は、 二量体をそれと共に形成する時に E G F R 、 H E R 3 、 または H E R 4 の細胞外ドメイン内の領域と接触するか、 または干渉する、 H E R 2 の細胞外ドメイン内の領域を指す。 この領域は、 H E R 2 のドメイン I I において見出される。 F r a n k l i n e t a l . C a n c e r C e l l 5 : 3 1 7 - 3 2 8 (2 0 0 4) 。

【 0 0 9 2 】

H E R 2 の「 ヘテロ二量体結合部位に結合する 」 H E R 2 抗体は、 ドメイン I I 内の残基に結合し（ および任意選択により、 ドメイン I および I I I 等の H E R 2 細胞外ドメインの他のドメイン内の残基にも結合し ）、 H E R 2 - E G F R 、 H E R 2 - H E R 3 、 または H E R 2 - H E R 4 ヘテロ二量体の形成を少なくともある程度立体的に妨害され得る。 F r a n k l i n e t a l . C a n c e r C e l l 5 : 3 1 7 - 3 2 8 (2 0 0 4) は、 R C S B タンパク質データバンクに預けられている（ I D コード I S 7 8 ） H E R 2 - ペルツズマブ結晶構造を特徴付け、 H E R 2 のヘテロ二量体結合部位に結合する例示の抗体を示す。 H E R 2 の「 ドメイン I I に結合する 」 抗体は、 ドメイン I I 内の残基、 および任意選択により、 ドメイン I および I I I 等の H E R 2 の他のドメイン（ 複数可 ）内の残基に結合する。

【 0 0 9 3 】

本明細書において開示される様々な抗体を説明するために使用されるとき、「 単離された 」 とは、 それが発現した細胞または細胞培養から特定され、 分離および / または回復された抗体を意味する。 その自然環境の汚染成分は、 典型的に、 ポリペプチドの診断または治療的使用を干渉する材料であり、 酵素、 ホルモン、 および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を含み得る。 好適な実施形態では、 抗体は、 (1) スピニングカップ配列決定器の使用により、 N 末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも 1 5 残基を得るために十分な程度で精製されるか、 または (2) クマシーブルー、 もしくは好ましくは銀染色を使用して、 非還元もしくは還元条件下で、 S D S - P A G E により均質に精製される。 単離した抗体は、 ポリペプチド自然環境の少なくとも 1 つの成分が存在しないため、 組み換え細胞内の原位置に抗体を含む。 しかしながら、 通常、 単離したポリペプチドは、 少なくとも 1 つの精製工程により調製される。

【 0 0 9 4 】

「 E r b B 3 癌検出薬 」 は、 E R B B 3 核酸配列またはアミノ酸配列内の E r b B 3 癌と関連付けられる変異を検出することができる薬剤を指す。 典型的に、 検出薬は、 E R B

10

20

30

40

50

B 3 配列に特異的に結合することができる試薬を含む。好適な実施形態では、この試薬は、E R B B 3 核酸配列中のE r b B 3 変異に特異的に結合することができる。一実施形態では、検出薬は、E R B B 3 核酸配列（例えば、配列番号1または3）に特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、このポリヌクレオチドは、変異を含むE r b B 3 配列に特異的にハイブリダイズする核酸配列を含むプローブである。別の実施形態では、検出薬は、E R B B 3 アミノ酸配列に特異的に結合することができる試薬を含む。別の実施形態では、アミノ酸配列は、本明細書に記載されるとおり、変異を含む。検出薬は、標識をさらに含み得る。好適な一実施形態では、E r b B 3 癌検出薬は、E r b B 3 消化管癌検出薬である。

【0095】

10

E r b B 3 体細胞変異

一態様では、本発明は、対象からの試料において癌と関連付けられるE r b B 3 体細胞変異の存在または不在を検出する方法、ならびに対象からの試料においてこれらの体細胞変異のうちの1つ以上の存在または不在を検出することにより、癌を診断および予後診断する方法を提供し、体細胞変異の存在は、対象が癌を有することを示す。癌の危険性と関連付けられるE r b B 3 体細胞変異は、ゲノム希望の関連研究、修飾因子スクリーン、および家族に基づくスクリーニングを含む戦略を使用して特定した。

【0096】

20

本発明の方法において使用するための体細胞変異または変化は、E r b B 3 中の変化、またはこのタンパク質をコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、この体細胞変異は、遺伝子（またはその調節領域）をコードするゲノムDNA中に存在する。様々な実施形態では、体細胞変異は、E r b B 3（配列番号1、受入番号NM_001982）をコードする核酸における置換、挿入、または欠失である。一実施形態では、変化は、E r b B 3（配列番号2、受入番号NM_001973）のアミノ酸配列中のM60、G69、M91、V104、Y111、R135、R193、A232、P262、Q281、G284、V295、Q298、G325、T389、R453、M406、V438、D492、K498、V714、Q809、S846、E928、S1046、R1089、T1164、およびD1194のうちの1つ以上にアミノ酸置換をもたらす変異である。一実施形態では、置換は、M60K、G69R、M91I、V104L、V104M、Y111C、R135L、R193*、A232V、P262S、P262H、Q281H、G284H、G284R、V295A、Q298*、G325R、T389K、M406K、V438I、R453H、D492H、K498I、V714M、Q809R、S846I、E928G、S1046N、R1089W、T1164A、およびD1194E（*は終止コドンを示す）のうちの少なくとも1つである。様々な実施形態では、少なくとも1つの変化は、E r b B 3 におけるアミノ酸置換、挿入、切断、または欠失である。いくつかの実施形態では、変化は、アミノ酸置換である。

30

【0097】

E r b B 3 変異の特定

40

本発明の重要な態様では、E r b B 3 アミノ酸残基のクラスターが変異多発点として特定されている。具体的には、ドメインI（配列番号2の1位～213位）とII（配列番号2の214位～284位）との間のインターフェースに少なくとも1つの置換を含むE r b B 3 は、E r b B 3 癌を示すことが見出されている。具体的には、体細胞変異の顕著な細胞外ドメイン（ECD）クラスターは、少なくともE r b B 3 アミノ酸残基104、232、および284により決定されるドメインI/IIインターフェースにおいて見出されている。一実施形態では、このドメインは、アミノ酸残基60によりさらに決定される。別の実施形態では、体細胞変異のクラスターは、V104～LまたはM、A232～V、およびG284～Rを含む。他の一実施形態では、このクラスターは、M60～Kを含む。

【0098】

50

一態様では、本発明は、対象から得られる生体試料において、ヒトE r b B 3 のドメイ

ン I I と I I I との間のアミノ酸位置 104、232、および 284 により決定される、インターフェースにおけるアミノ酸変異の存在または不在を決定する方法を提供する。このインターフェースは、60 位によりさらに決定され得る。

【0099】

体細胞変異の検出

本明細書に記載される検出方法のいずれかにおいて使用する際、核酸は、ゲノム DNA、ゲノム DNA から転写される RNA、RNA から生成される cDNA であり得る。核酸は、脊椎動物、例えば、哺乳類に由来し得る。核酸は、それがその源から直接得られるか、またはその源において見出される核酸の複製である場合、特定の源「に由来する」と言われる。

10

【0100】

核酸は、その核酸の複製、例えば、増幅から生じる複製を含む。増幅は、ある例では、例えば、変型を検出するための所望の量の材料を得るために望ましい場合がある。次に、増幅産物を以下に記載されるもの等の変型検出法に供して、増幅産物中に変型が存在するかどうかを決定する。

【0101】

体細胞変異または変型は、当業者に既知のある方法により検出され得る。そのような方法とし、DNA 配列決定；体細胞変異特異的スクレオチド組み込みアッセイおよび体細胞変異特異的プライマー伸長アッセイ等のプライマー伸長分析（例えば、体細胞変異特異的 PCR、体細胞変異特異的結紮連鎖反応（LCR）、およびギャップ-LCR）；変異特異的オリゴスクレオチドハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、オリゴスクレオチド結紮アッセイ）；切断剤からの保護を使用して核酸二本鎖中のミスマッチ塩基を検出する切断保護アッセイ；MutS タンパク質結合の分析；変型および野生型核酸分子の移動性を比較する電気泳動分析；変性勾配ゲル電気泳動（DGGE、例えば、Myers et al. (1985) Nature 313: 495）；ミスマッチ塩基対における RNase 切断の分析；ヘテロ二本鎖 DNA の化学的または酵素的切断の分析；質量分析（例えば、MALDI-TOF）；遺伝子ピット分析（GBA）；5'スクレアーゼ分析（例えば、TaqMan（商標））、および分子指標を用いるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法の一部は、以下でさらに詳述される。

20

【0102】

標的核酸中の変型の検出は、当該技術分野において周知の技術を使用して、標的核酸の分子クローニングおよび配列決定により達成され得る。代替として、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）等の増幅技術を使用して、腫瘍組織からのゲノム DNA 調製から直接標的核酸配列を増幅させることができる。次に、増幅した配列の核酸配列を決定し、そこから変型を特定することができる。増幅技術は当該技術分野において周知であり、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応は、Saiki et al., Science 239: 487, 1988、米国特許第 4,683,203 号、および第 4,683,195 号に記載される。

30

【0103】

当該技術分野において既知のリガーゼ連鎖反応を使用して、標的核酸配列を増幅させることもできる。例えば、Wu et al., Genomics 4: 560-569 (1989) を参照されたい。さらに、対立遺伝子特異的 PCR として知られる技術を修正して、体細胞変異（例えば、置換）を検出するために使用することもできる。例えば、Ruano and Kidd (1989) Nucleic Acids Research 17: 8392、McCay et al. (2002) Analytical Biochem. 301: 200-206 を参照されたい。この技術のある実施形態では、変異特異的プライマーは、プライマーの 3' 末端スクレオチドが、標的核酸中の特定の変型に相補的である（すなわち、それと特異的に塩基対合することができる）。特定の変型が存在しない場合、増幅産物は観測されない。増幅抵抗変異システム（ARMS）を使用して、変型（例えば、置換）を検出することもできる。ARMS は、例えば、欧州特許

40

50

出願公開第0332435号において、およびNewton et al., Nucleic Acids Research, 17:7, 1989において説明される。

【0104】

変型（例えば、置換）を検出するために有用な他の方法として、（1）変異特異的ヌクレオチド組み込みアッセイ、例えば、単一塩基伸長アッセイ（例えば、Chen et al. (2000) Genome Res. 10: 549-557、Fan et al. (2000) Genome Res. 10: 853-860、Pastinen et al. (1997) Genome Res. 7: 606-614、およびYe et al. (2001) Hum. Mut. 17: 305-316参照）、（2）変異特異的プライマー伸長アッセイ（例えば、Ye et al. (2001) Hum. Mut. 17: 305-316、およびShen et al. Genetic Engineering News, vol. 23, Mar. 15, 2003参照）（対立遺伝子特異的PCRを含む）、（3）5'ヌクレアーゼアッセイ（例えば、De La Vega et al. (2002) Biotechniques 32: S48-S54 (TaqMan RTM.アッセイについて説明する)、Ranade et al. (2001) Genome Res. 11: 1262-1268、およびShi (2001) Clin. Chem. 47: 164-172参照）、（4）分子指標を用いるアッセイ（例えば、Tyagi et al. (1998) Nature Biotech. 16: 49-53、およびMhlanga et al. (2001) Methods 25: 463-71）、および（5）オリゴヌクレオチド結紮アッセイ（例えば、Grossman et al. (1994) Nuc. Acids Res. 22: 4527-4534、特許出願公開第US2003/0119004 A1、PCT国際公開第WO01/92579 A2、および米国特許第6,027,889号参照）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0105】

変型は、ミスマッチ検出法により検出されてもよい。ミスマッチは、100%相補的でないハイブリダイズされた核酸二本鎖である。総相補性の欠損は、欠失、挿入、変換、または置換に起因し得る。ミスマッチ検出法の一例は、ミスマッチ修復検出（MRD）アッセイであり、例えば、Faham et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 14717-14722 (2005) およびFaham et al., Hum. Mol. Genet. 10: 1657-1664 (2001) に記載されている。ミスマッチ切断技術の別の例は、RNase保護法であり、Winter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 7575, 1985、およびMyers et al., Science 230: 1242, 1985に詳細に記載されている。例えば、本発明の方法は、ヒト野生型標的核酸に相補的な標識リボプローブの使用を必要とし得る。組織試料に由来するリボプローブおよび標的核酸は、一緒にアニール（ハイブリダイズ）され、次に二本鎖RNA構造中のいくつかのミスマッチを検出することができる、酵素RNase Aを用いて分解される。ミスマッチがRNase Aにより検出される場合、ミスマッチの部位で切断する。したがって、アニールされたRNA調製物が電気泳動ゲルマトリックス上で分離されるとき、ミスマッチが検出され、RNase Aにより切断された場合、リボプローブおよびmRNAまたはDNAの完全長二本鎖RNAより小さいRNA産物が見られる。リボプローブは、変型を有することが疑われる位置を包含するならば、完全長の標的核酸である必要はないが、標的核酸の一部分であり得る。

【0106】

同様の方法で、DNAプローブを使用して、例えば、酵素的または化学的切断を介してミスマッチを検出することができる。例えば、Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4397, 1988、およびShenk et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72: 989, 1975を参照されたい。代替として、ミスマッチは、マッチ二本鎖に対して、ミスマッチ二本

10

20

30

40

50

鎖の電気泳動移動度の変動により検出されることができる。例えば、Carriello, Human Genetics, 42: 726, 1988を参照されたい。リボプローブまたはDNAプローブのいずれかを用いて、変型を含むことが疑われる標的核酸は、ハイブリダイゼーション前に増幅され得る。標的核酸の変化は、特にこの変化が欠失および挿入等のグロス再配置である場合、サザンハイブリダイゼーションを使用して検出することもできる。

【0107】

標的核酸または周囲のマークー遺伝子の制限断片長多型 (RFLP) プローブを使用して、変型（例えば、挿入または欠失）を検出することができる。挿入および欠失は、標的核酸のクローニング、配列決定、および増幅により検出することもできる。一本鎖構成多型 (SSCP) 分析を使用して、対立遺伝子の塩基変化変異体を検出することもできる。例えば、Orita et al., Proc. Natl. Sci. USA 86: 2766-2770, 1989、およびGenomics, 5: 874-879, 1989を参照されたい。SSCPは、Erbb3体細胞変異の検出のために修飾されることができる。SSCPは、一本鎖PCR産物の電気泳動移行の変化により塩基差を特定する。一本鎖PCR産物は、二本鎖PCR産物を加熱するか、または他の方法で変性させることにより生成されることができる。一本鎖核酸は、塩基配列に部分的に依存する二次構造を理ボルディングまたは形成し得る。一本鎖増幅産物の異なる電気泳動移動度は、SNP位置での塩基配列差に関連する。変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) は、多型DNAに特徴の異なる配列依存性安定度および溶解特性、ならびに変性勾配ゲル中の電気泳動移行パターンにおける対応する差に基づいて、SNP対立遺伝子を区別する。

10

20

30

40

【0108】

体細胞変異または変型は、マイクロアレイの使用により検出されてもよい。マイクロアレイは、典型的に数千の核酸プローブの配列を使用して、高度に厳密な条件下で、例えば、cDNAまたはcRNA試料を用いてハイブリダイズする、多重技術である。プローブ標的ハイブリダイゼーションは、典型的に、フルオロフォア、銀、または化学発光標識された標的の検出により検出および定量化されて、標的中の核酸配列の相対存在度を決定する。典型的なマイクロアレイでは、プローブは、化学マトリックス（エポキシ-シラン、アミノ-シラン、リシン、ポリアクリルアミド、またはその他）への共有結合により個体表面に取り付けられる。個体表面は、例えば、ガラス、シリコンチップ、または微小ビーズである。様々なマイクロアレイは、市販されており、例えば、Affymetrix, Inc. および Illumina, Inc. により製造されるものを含む。

【0109】

体細胞変異の検出のための別な方法は、質量分析に基づく。質量分析は、DNAの4つのヌクレオチドのそれぞれの固有質量を利用する。潜在的な変異含有Erbb3核酸は、体細胞変異を有する核酸の質量の差を測定することにより質量分析によって明確に分析されることができる。MALDI-TOF（マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型）質量分析技術は、体細胞変異を含む核酸等の分枝質量の極めて精密な決定に有用である。核酸分析に対する多数の手法は、質量分析に基づいて開発された。例示の質量分析に基づく方法は、伝統的なゲルベースのフォーマットおよびマイクロアレイ等の他の手法と併せて利用することもできる、プライマー伸長アッセイを含む。

【0110】

配列特異的リボザイム（米国特許第5,498,531号）を使用して、リボザイム切断部位の開発または喪失に基づいて体細胞変異を検出することもできる。完全にマッチした配列は、ヌクレアーゼ切断消化アッセイまたは溶解温度の差により、ミスマッチ配列から区別され得る。変異が制限酵素切断部位に影響を及ぼす場合、変異は、制限酵素消化パターンにおける変化、およびゲル電気泳動により決定される核酸断片長の対応する変化により特定することができる。

【0111】

本発明の他の実施形態では、タンパク質に基づく検出技術を使用して、本明細書に開示

50

される遺伝的変型を有する遺伝子によりコードされる変異タンパク質を検出する。タンパク質の変異形態の存在の決定は、当該技術分野において既知の任意の適切な技術、例えば、電気泳動（例えば、変性または非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動；2次元ゲル電気泳動；キャピラリー電気泳動、および等電点電気泳動）、クロマトグラフィー（例えば、サイジングクロマトグラフィー、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、および陽イオン交換HPLC）、および質量分析（例えば、MALDI-TOF質量分析、エレクトロスプレーイオン化（ESI）質量分析、およびタンデム質量分析）を使用して実行することができる。例えば、Ahrer and Jungabauer (2006) J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 841: 110-122、およびWada (2002) J. Chromatogr. B. 781: 291-301）を参照されたい。¹⁰ 適切な技術は、検出される変型の性質に部分的に基づいて選択され得る。例えば、置換アミノ酸が元のアミノ酸とは異なる電荷を有するアミノ酸置換をもたらす変型は、等電点電気泳動法により検出されることがある。高電圧でpH勾配を有するゲルを介したポリペプチドの等電点電気泳動法は、それらのpHによりタンパク質を分離する。pH勾配ゲルは、野生型タンパク質を含む同時走行ゲルと比較することができる。変型が新たなタンパク質分解切断部位の生成、または既存のものの廃絶をもたらす場合、試料は、適切な電気泳動、クロマトグラフィー、または質量分析技術を使用して、タンパク分解に供された後、ペプチドマッピングに供され得る。変型の存在は、エドマン分解またはある形態の質量分析等のタンパク質配列決定技術を使用して検出されてもよい。²⁰

【0112】

これらの技術の組み合わせを使用する当該技術分野において既知の方法が使用されてもよい。例えば、HPLC顕微鏡タンデム質量分析技術では、タンパク分解は、タンパク質上で行われ、得られるペプチド混合物は、逆相クロマトグラフ分離により分離される。次にタンデム質量分析を行い、そこから収集したデータを分析する。（Gatlin et al. (2000) Anal. Chem., 72: 757-763）。別の例では、非変性ゲル電気泳動は、MALDI質量分析と組み合わされる（Matthew et al. (2011) Anal. Biochem. 416: 135-137）。

【0113】

いくつかの実施形態では、タンパク質は、タンパク質に特異的に結合する抗体またはペプチド等の試薬を使用して、試料から単離されてよく、次にさらに分析して、上で開示された技術のうちのいずれかを使用して、遺伝的変型の存在または不在を決定する。³⁰

【0114】

代替として、試料中の変異タンパク質の存在は、本発明による遺伝的変異を有するタンパク質に特異的な抗体、つまり、変型を有するタンパク質に特異的に結合するが、変型を欠失するタンパク質の形態には結合しない抗体に基づいて、免疫親和性アッセイにより検出され得る。そのような抗体は、当該技術分野において既知の任意の適切な技術により生成されることができる。抗体を使用して、溶液試料からの特定タンパク質を免疫沈降させるか、または、例えば、ポリアクリルアミドゲルにより分離されたタンパク質を免疫プロットすることができる。免疫細胞化学的方法は、組織または細胞中の特定のタンパク質変型を検出する際に使用することもできる。例えば、酵素免疫測定吸着法（ELISA）、放射性免疫アッセイ（RIA）、免疫放射定量測定アッセイ（IRMA）、および免疫酵素アッセイ（IEMA）を含む、免疫結合他の周知の抗体に基づく技術を使用することもでき、モノクローナルまたはポリクローナル抗体を使用するサンドイッチアッセイを含む。例えば、米国特許第4,376,110号および第4,486,530号を参照されたい。⁴⁰

【0115】

遺伝子マーカーの特定

体細胞変異と生殖細胞変異との間の関係は、癌において調査した（例えば、Zauber et al. J. Pathol. 2003 Feb; 199(2): 146-51参

10

20

30

40

50

照)。本明細書に開示される *ErbB3* 体細胞変異は、癌の発達と関連付けられる遺伝子マーカーを特定するために有用である。例えば、本明細書に開示される体細胞変異を使用して、生殖細胞中の単一ヌクレオチド多型 (SNP) および連鎖不均衡である任意の追加の SNP を特定することができる。実際に、癌と関連付けられる第 1 の SNP と連鎖不均衡である任意の追加の SNP は、癌と関連付けられる。指定の SNP と癌との間の関連が実証されると、癌と関連付けられる追加の SNP の発見は、この特定領域内の SNP の密度を増加させるために非常な关心であり得る。

【0116】

追加の SNP を特定し、連鎖不均衡分析を行うための方法は、当該技術分野において周知である。例えば、本明細書に開示される SNP と連鎖不均衡である追加の SNP の特定は、(a) 複数の個人からの第 1 の SNP を含むか、または取り囲むゲノム領域からの断片を増幅させるステップと、(b) 該第 1 の SNP を内包するか、または取り囲むゲノム領域内の第 2 の SNP を特定するステップと、(c) 該第 1 の SNP と該第 2 の SNP との間の連鎖不均衡分析を行うステップと、(d) 該第 2 の SNP を、該第 1 のマーカーと連鎖不均衡であるとして選択するステップと、を必要とし得る。この方法は、ステップ (a) に先行して、複数の個人からの体細胞変異を含むか、または取り囲むゲノム領域からの断片を増幅させること、および該体細胞変異を内包するか、または取り囲むゲノム領域内の SNP を特定すること等の、あるステップを含むように修正され得る。

10

【0117】

ErbB3 癌検出薬

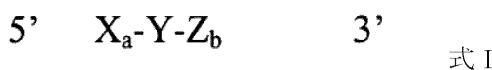
20

一態様では、本発明は、*ErbB3* 癌検出薬を提供する。一実施形態では、この検出薬は、図 39 に示される *ErbB3* 配列 (配列 2 のアミノ酸配列または配列番号 3 の核酸配列) に特異的に結合することができる試薬を含む。別の実施形態では、検出薬は、図 2 (配列番号 1) または図 39 (配列番号 3) に示される *ERBB3* 核酸配列に特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドを含む。好適な実施形態では、ポリヌクレオチドは、図 39 に示される変異を含む *ErbB3* 核酸配列に特異的にハイブリダイズする、核酸配列を含む (配列番号 3)。

【0118】

別の態様では、*ErbB3* 癌検出薬は、特定の式を有するポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、ポリヌクレオチド式は、

30



であり、式中、

X は任意の核酸であり、a は約 0 ~ 約 250 (すなわち、5' 方向) であり、

Y は *ErbB3* 変異コドンを表し、

Z は任意の核酸であり、b は約 0 ~ 約 250 (すなわち、3' 方向) である。

【0119】

別の実施形態では、a または b は、約 250 以下、または 5' (a の場合) もしくは 3' (b の場合) 方向である。いくつかの実施形態では、a または b は、約 0 ~ 約 250 であり、a または b は、約 0 ~ 約 245、約 0 ~ 約 240、約 0 ~ 約 230、約 0 ~ 約 220、約 0 ~ 約 210、約 0 ~ 約 200、約 0 ~ 約 190、約 0 ~ 約 180、約 0 ~ 約 170、約 0 ~ 約 160、約 0 ~ 約 150、約 0 ~ 約 140、約 0 ~ 約 130、約 0 ~ 約 120、約 0 ~ 約 110、約 0 ~ 約 100、約 0 ~ 約 90、約 0 ~ 約 80、約 0 ~ 約 70、約 0 ~ 約 60、約 0 ~ 約 50、約 0 ~ 約 45、約 0 ~ 約 40、約 0 ~ 約 35、約 0 ~ 約 30、約 0 ~ 約 25、約 0 ~ 約 20、約 0 ~ 約 15、約 0 ~ 約 10、または約 0 ~ 約 5 である。

40

【0120】

他の一実施形態では、a または b は、約 35 以下である。いくつかの実施形態では、a または b は、約 0 ~ 約 35、約 0 ~ 約 34、約 0 ~ 約 33、約 0 ~ 約 32、約 0 ~ 約 31

50

、約0～約30、約0～約29、約0～約28、約0～約27、

【0121】

約0～約26、約0～約25、約0～約24、約0～約23、約0～約22、約0～約21、約0～約20、約0～約19、約0～約18、約0～約17、約0～約16、約0～約15、約0～約14、約0～約13、約0～約12、約0～約11、約0～約10、約0～約9、約0～約8、約0～約7、約0～約6、約0～約5、約0～約4、約0～約3、または約0～約2である。

【0122】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の60位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、AAAおよびAAGからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるM60K変異に対応する。

10

【0123】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の104位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、ATG、CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、およびTTGからなる群から選択される。これは、結腸癌、胃癌、卵巣癌および乳癌と関連付けられるV104MまたはV104L変異に対応する。

20

【0124】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の111位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、TGTおよびTGCからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるY111C変異に対応する。

20

【0125】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の135位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、およびTTGからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるR135L変異に対応する。

30

【0126】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の193位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、TAA、TAG、およびTGAからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるR193*（*は終止コドンである）変異に対応する。

30

【0127】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の232位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、GTT、GTC、GTA、およびG TGからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるA232V変異に対応する。

40

【0128】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の262位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CAT、CAC、TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、およびAGCからなる群から選択される。これは、結腸癌および/または胃癌と関連付けられるP262HまたはP262S変異に対応する。

40

【0129】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の284位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CGT、CGC、CGA、CGG、AGA、およびAGGからなる群から選択される。これは、結腸癌または肺癌（NSCLC腺癌）と関連付けられるG284R変異に対応する。

50

【0130】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の295位においてアミノ酸をコードするEr bB3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、GCT、GCC、GCA、およびGCGからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるV295A変異に対応する。

【0131】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の325位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CGT、CGC、CGA、C GG、AGA、およびAGGからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるG325R変異に対応する。

【0132】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の406位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、ACT、ACC、AGA、ACG、AAAおよびAAGからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるM406KまたはM406T変異に対応する。

10

【0133】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の453位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CATおよびCACからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるR453H変異に対応する。

【0134】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の498位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、ATT、ATC、およびATAからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるK498I変異に対応する。

20

【0135】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の809位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CGT、CGC、CGA、C GG、AGA、およびAGGからなる群から選択される。これは、胃癌と関連付けられるQ809R変異に対応する。

【0136】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の846位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、ATT、ATC、およびATAからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるS846I変異に対応する。

30

【0137】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の928位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、GGT、GGC、GGA、およびGGGからなる群から選択される。これは、胃癌および乳癌と関連付けられるE928G変異に対応する。

【0138】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の1089位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、TGGである。これは、胃癌と関連付けられるR1089W変異に対応する。

【0139】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の1164位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、GCT、GCC、GCA、およびGCGからなる群から選択される。これは、結腸癌と関連付けられるT1164A変異に対応する。

40

【0140】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の492位においてアミノ酸をコードするEr b B 3核酸配列にハイブリダイズし、Yは、CATおよびCACからなる群から選択される。これは、肺癌（NSCLC腺癌）と関連付けられるD492H変異に対応する。

【0141】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号2の714位においてアミノ酸をコ

50

ードする *ErbB3* 核酸配列にハイブリダイズし、Yは、ATGである。これは、肺癌 (NSCLC 腺癌) と関連付けられる V714M 变異に対応する。

【0142】

癌の診断、予後診断、および治療

本発明は、対象からの試料中の本明細書に開示される癌と関連付けられる 1 つ以上の細胞変異または変型の存在を検出することにより、対象における癌の診断または予後診断の方法を提供する。本発明の方法において使用するための細胞変異または変型は、*ErbB3* 中の変型、またはこのタンパク質をコードする遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、この細胞変異は、遺伝子（またはその調節領域）をコードするゲノムDNA 中に存在する。様々な実施形態では、細胞変異は、*ErbB3* をコードする核酸における置換、挿入、または欠失である。一実施形態では、変型は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の M60、G69、M91、V104、Y111、R135、R193、A232、P262、Q281、G284、V295、Q298、G325、T389、R453、M406、V438、D492、K498、V714、Q809、S846、E928、S1046、R1089、T1164、および D1194 のうちの 1 つ以上にアミノ酸置換をもたらす変異である。一実施形態では、置換は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の M60K、G69R、M91I、V104L、V104M、Y111C、R135L、R193*、A232V、P262S、P262H、Q281H、G284H、G284R、V295A、Q298*、G325R、T389K、M406K、V438I、R453H、D492H、K498I、V714M、Q809R、S846I、E928G、S1046N、R1089W、T1164A、および D1194E（*は終止コドンを示す）のうちの少なくとも 1 つである。一実施形態では、変異は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、結腸直腸癌、非小細胞肺 (NSCLC) 腺癌、NSCLC (扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌 (SCLC)、肝細胞癌 (HCC)、肺癌、および膵臓癌からなる群から選択される、*ErbB3* 癌の存在を示す。

【0143】

他の一実施形態では、変化は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の M60、V104、Y111、R153、R193、A232、P262、V295、G325、M406、R453、D492、K498、V714、Q809、R1089、および T1164 のうちの 1 つ以上にアミノ酸置換をもたらす変異である。別の実施形態では、置換は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の M60K、V104M、V104L、Y111C、R153L、R193*、A232V、P262S、P262H、V295A、G325R、M406K、R453H、D492H、K498I、V714M、Q809R、R1089W、および D1194E（*は終止コドンを示す）のうちの少なくとも 1 つである。一実施形態では、変異は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、結腸直腸癌、非小細胞肺 (NSCLC) 腺癌、NSCLC (扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌 (SCLC)、肝細胞癌 (HCC)、肺癌、および膵臓癌からなる群から選択される、*ErbB3* 癌の存在を示す。

【0144】

他の一実施形態では、変化は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の V104、Y111、R153、A232、P262、G284、T389、R453、K498、および Q809 のうちの 1 つ以上にアミノ酸置換をもたらす変異である。別の実施形態では、置換は、*ErbB3*（配列番号 2）のアミノ酸配列中の V104L、V104M、Y111C、R153L、A232V、P262S、P262H、G284R、T389K、R453H、K498I、および Q809R のうちの少なくとも 1 つである。一実施形態では、*ErbB3* 变異は、消化管癌の存在を示す。別の実施形態では、消化管癌は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、および結腸直腸癌のうちの 1 つである。

【0145】

一実施形態では、*ErbB3* 置換は、M60 に存在する。別の実施形態では、置換は、

10

20

30

40

50

M 6 0 K である。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

【0 1 4 6】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、V 1 0 4 に存在する。別の実施形態では、置換は、V 1 0 4 L またはV 1 0 4 M である。他の一実施形態では、変異は、胃癌または結腸癌の存在を示す。

【0 1 4 7】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、V 1 1 1 に存在する。別の実施形態では、置換は、V 1 1 1 C である。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 4 8】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、R 1 3 5 に存在する。別の実施形態では、置換は、R 1 3 5 L である。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 4 9】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、R 1 9 3 に存在する。別の実施形態では、置換は、R 1 9 3 * である。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

【0 1 5 0】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、A 2 3 2 に存在する。別の実施形態では、置換は、A 2 3 2 V である。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 5 1】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、P 2 6 2 に存在する。別の実施形態では、置換は、P 2 6 2 S またはP 2 6 2 H である。他の一実施形態では、変異は、結腸癌または胃癌の存在を示す。

【0 1 5 2】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、G 2 8 4 に存在する。別の実施形態では、置換は、G 2 8 4 R である。他の一実施形態では、変異は、肺癌（非小細胞肺（N S C L C ）腺癌）または結腸癌の存在を示す。

【0 1 5 3】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、V 2 9 5 に存在する。別の実施形態では、置換は、V 2 9 5 A である。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

【0 1 5 4】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、G 3 2 5 に存在する。別の実施形態では、置換は、G 3 2 5 R である。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

【0 1 5 5】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、M 4 0 6 に存在する。別の実施形態では、置換は、M 4 0 6 K である。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 5 6】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、R 4 5 3 に存在する。別の実施形態では、置換は、R 4 5 3 H である。他の一実施形態では、変異は、胃癌または結腸癌の存在を示す。

【0 1 5 7】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、K 4 9 8 に存在する。別の実施形態では、置換は、K 4 9 8 I である。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 5 8】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、D 4 9 2 に存在する。別の実施形態では、置換は、D 4 9 2 H である。他の一実施形態では、変異は、肺癌（非小細胞肺（N S C L C ）腺癌）の存在を示す。

【0 1 5 9】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、V 7 1 4 に存在する。別の実施形態では、置換は、V 7 1 4 M である。他の一実施形態では、変異は、肺癌（非小細胞肺（N S C L C ）扁平上皮癌）の存在を示す。

【0 1 6 0】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、Q 8 0 9 に存在する。別の実施形態では、置換は

10

20

30

40

50

、Q 8 0 9 Rである。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 6 1】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、S 8 4 6 に存在する。別の実施形態では、置換は、S 8 4 6 Iである。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

【0 1 6 2】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、R 1 0 8 9 に存在する。別の実施形態では、置換は、R 1 0 8 9 Wである。他の一実施形態では、変異は、胃癌の存在を示す。

【0 1 6 3】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、T 1 1 6 4 に存在する。別の実施形態では、置換は、T 1 1 6 4 Aである。他の一実施形態では、変異は、結腸癌の存在を示す。

10

【0 1 6 4】

様々な実施形態では、少なくとも1つの変型は、E r b B 3 におけるアミノ酸置換、挿入、切断、または欠失である。いくつかの実施形態では、変型は、アミノ酸置換である。これらの変型のうちの任意の1つ以上は、以下に記載される検出、診断、および予後診断の方法のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【0 1 6 5】

一実施形態では、本発明は、対象における癌を示す体細胞変異の存在または不在を検出するための方法を提供し、(a)対象からの試料を、E r b B 3 遺伝子における体細胞変異の存在または不在を検出することができる試薬と接触させることと、(b)変異の存在または不在を決定することと、を含み、変異の存在は、対象が、癌を患っているか、または発症する危険性があることを示す。

20

【0 1 6 6】

本方法において使用するための試薬は、オリゴヌクレオチド、DNAプローブ、RNAプローブ、およびリボザイムであり得る。いくつかの実施形態では、試薬は標識される。標識としては、例えば、放射性同位元素標識、蛍光標識、生物発光標識、または酵素標識が挙げられ得る。検出可能な標識として機能することができる放射性核種として、例えば、I - 1 3 1、I - 1 2 3、I - 1 2 5、Y - 9 0、R e - 1 8 8、R e - 1 8 6、A t - 2 1 1、C u - 6 7、B i - 2 1 2、およびP d - 1 0 9が挙げられる。

【0 1 6 7】

対象における癌を示す体細胞変異を検出するための方法も提供され、対象からの生体試料を、E r b B 3 遺伝子における体細胞変異の存在または不在を検出することを含み、変異の存在は、対象が、癌を患っているか、または発症する危険性があることを示す。本方法の様々な実施形態では、1つ以上の体細胞変異の存在の検出は、直接配列決定、変異特異的プローブハイブリダイゼーション、変異特異的プライマー伸長、変異特異的増幅、変異特異的ヌクレオチド組み込み、5'ヌクレアーゼ分解、分子指標アッセイ、オリゴヌクレオチド結紮アッセイ、サイズ分析、および一本鎖構成多型からなる群から選択されるプロセスにより実行される。いくつかの実施形態では、試料からの核酸は、1つ以上の変異の存在を決定する前に増幅される。

30

【0 1 6 8】

本発明は、対象における癌を診断または予後診断するための方法をさらに提供し、(a)対象からの試料を、E r b B 3 遺伝子における体細胞変異の存在または不在を検出することができる試薬と接触させることと、(b)変異の存在または不在を決定することと、を含み、変異の存在は、対象が、癌を患っているか、または発症する危険性があることを示す。

40

【0 1 6 9】

本発明は、対象における癌を診断または予後診断する方法をさらに提供し、対象からの生体試料を、E r b B 3 遺伝子における体細胞変異の存在または不在を検出することを含み、遺伝子変異の存在は、対象が、癌を患っているか、または発症する危険性があることを示す。

【0 1 7 0】

50

本発明は、対象における癌を診断または予後診断する方法も提供し、(a)対象からの試料を含む核酸を得ることと、(b)その試料を分析して、ErbB3遺伝子における少なくとも1つの体細胞変異の存在を検出することと、を含み、遺伝的変異の存在は、対象が、癌を患っているか、または発症する危険性があることを示す。

【0171】

いくつかの実施形態では、診断または予後診断の方法は、対象を癌について1つ以上の追加の診断検査に供すること、例えば、1つ以上の追加のマーカーをスクリーニングすること、または対象を撮像手技に供することをさらに含む。

【0172】

上記方法のうちのいずれかは、この方法の結果に基づいて、対象の癌を治療することをさらに含む。いくつかの実施形態では、上記方法は、試料中の少なくとも1つの体細胞変異の存在を検出することをさらに含む。一実施形態では、第1の体細胞変異の存在は、少なくとも1つの追加の体細胞変異の存在と一緒に、第1の体細胞変異を有し、少なくとも1つの追加の体細胞変異の存在を欠く対象と比較して、癌の危険性の増加を示す。

10

【0173】

癌の診断の危険性が高い対象を特定する方法も提供され、(a)対象からの生体試料を、ErbB3遺伝子における第1の体細胞変異の存在または不在を検出することと、(b)少なくとも1つの追加の体細胞変異の存在または不在を決定することと、を含み、第1および少なくとも1つの追加の体細胞変異の存在は、対象が、この第1および少なくとも1つの追加の体細胞変異の存在を欠く対象と比較して、癌の診断の危険性が高いことを示す。

20

【0174】

対象における癌の亜表現型の診断および/または予後診断を補助する方法も提供され、この方法は、対象に由来する生体試料においてErbB3をコードする遺伝子における体細胞変異の存在を検出することを含む。一実施形態では、体細胞変異は、ErbB3(配列番号2)のアミノ酸配列中のアミノ酸置換G284Rをもたらし、癌の亜表現型は、G284R変異体ErbB3を発現する細胞のHERリガンド非依存性シグナル伝達により少なくとも部分的に特徴付けられる。別の実施形態では、体細胞変異は、ErbB3(配列番号2)のアミノ酸配列中のアミノ酸置換Q809Rをもたらし、癌の亜表現型は、Q809R変異体ErbB3を発現する細胞のHERリガンド非依存性シグナル伝達により少なくとも部分的に特徴付けられる。

30

【0175】

本発明は、ErbB受容体を標的とする癌治療薬に対する対象の応答を予測する方法をさらに提供し、対象から得られる生体試料においてErbB3(配列番号2)のアミノ酸配列中のアミノ酸変異をもたらし、体細胞変異の存在は、ErbB受容体を標的とする治療薬に対する応答を示す。一実施形態では、治療薬は、ErbB拮抗薬または結合剤、例えば、抗ErbB抗体である。

【0176】

上記の方法のいずれかにおいて使用するための生体試料は、当業者に既知のある方法を使用して得られ得る。生体試料は、脊椎動物、具体的には、哺乳類から得られ得る。ある実施形態では、生体試料は、細胞または組織を含む。標的核酸(またはコードされるポリペプチド)の変化は、組織試料から検出され得るか、または血液、血清、尿、痰、唾液、粘膜、および組織等の他の体試料から検出され得る。そのような体試料をスクリーニングすることにより、癌等の疾患について簡素な早期診断を達成することができる。さらに、治療の進行は、標的核酸(またはコードされるポリペプチド)の変化についてそのような体試料を検査することにより、より容易に監視されることができる。いくつかの実施形態では、生体試料は、癌を有することが疑われる個人から得られる。

40

【0177】

対象または該対象から得られる生体試料が、本明細書に開示される体細胞変異を含むことを決定した後、有効な量の適切な癌治療薬が、対象における癌を治療するために対象に

50

投与され得ることが企図される。

【0178】

上記の方法に従って、ErbB3中に体細胞変異を含む核酸における1つ以上の変異の存在を検出することにより、哺乳類における癌の診断を補助するための方法も提供される。

【0179】

別の実施形態では、上記の方法に従って、対象がErbB3における体細胞変異を含むか否かを決定することにより、癌を有する対象が、治療薬に応答するか否かを予測するための方法が提供される。

【0180】

対象におけるErbB3中の体細胞変異の存在または不在を検出することにより、対象が癌を発症する素因を評価するための方法も提供される。

【0181】

哺乳類における癌を亜分類する方法も提供され、この方法は、ErbB3中の体細胞変異の存在を検出することを含む。

【0182】

患者の亜集団における癌を治療するために有効な治療薬を特定する方法も提供され、この方法は、薬剤の有効性をErbB3中の体細胞変異の存在と相關させることを含む。

【0183】

追加の方法は、適切な場合、および必要に応じて、適切な臨床介入ステップを決定するために有用な情報を提供する。したがって、本発明の方法の一実施形態では、この方法は、本明細書に開示される、癌と関連付けられるErbB3体細胞変異の存在または不在の評価の結果に基づく臨床介入ステップをさらに含む。例えば、適切な介入は、予防的および治療ステップ、または本発明の方法により得られる遺伝的情報に基づく任意の同時最新の予防または治療ステップの調整（複数可）を必要とし得る。

【0184】

当業者に明らかとなるように、本明細書に記載の任意の方法では、体細胞変異の存在の検出は、疾患の特徴（例えば、疾患の存在または亜型）を明確に示し、体細胞変異の非検出もまた、疾患の相互特性化を提供することにより有益である。

【0185】

なおさらなる方法は、哺乳類における癌を治療する方法を含み、哺乳類から生体試料を得るステップと、この生体試料を、本明細書に開示されるErbB3体細胞変異の存在について調べるステップと、該組織または細胞試料中の変異の存在または不在を決定するときに、有効な量の適切な治療薬を該哺乳類に投与するステップと、を含む。任意選択により、この方法は、有効な量の標的された癌治療薬を該哺乳類に投与することを含む。

【0186】

ErbB3体細胞変異が存在することが知られている対象における癌を治療する方法も提供され、この方法は、癌を治療するために有効な治療薬を対象に投与することを含む。

【0187】

癌を有する対象を治療する方法も提供され、この方法は、少なくとも1つの臨床研究における該癌を治療するために有効であることが以前に示された治療薬を対象に投与することを含み、この薬剤は、それぞれがErbB3体細胞変異を有している少なくとも5人のヒト対象に投与された。一実施形態では、少なくとも5人の対象は、少なくとも5人の対象群について合計で2つ以上の異なる体細胞変異を有した。一実施形態では、少なくとも5人の対象は、少なくとも5人の対象群全体で同一の体細胞変異を有した。

【0188】

特定の癌患者亜集団の癌対象を治療する方法も提供され、該亜集団に対する治療薬として承認される有効な量の治療薬を対象に投与することを含み、この亜集団は、ErbB3体細胞変異との少なくとも部分的な関連により特徴付けられる。

【0189】

10

20

30

40

50

一実施形態では、亞集団はヨーロッパ系である。一実施形態では、本発明は、癌治療薬を製造することと、癌を有するか、または有すると考えられる、およびErbB3体細胞変異を有する対象に薬剤を投与するための指示書と共に薬剤をパッケージ化することと、を含む。

【0190】

癌治療薬で治療するために、癌を患う患者を選択する方法も提供され、ErbB3体細胞変異の存在を検出することを含む。

【0191】

癌の治療のための治療薬は、いくつかの実施形態では、製薬学的用途に適切な組成物に組み込まれ得る。このような組成物は、典型的に、ペプチドまたはポリペプチド、および許容される担体、例えば、製薬学的に許容されるものを含む。「製薬学的に許容される担体」として、医薬投与に適合する、任意および全ての溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤等が挙げられる(Gennaro, Remington: The science and practice of pharmacy. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. (2000))。そのような担体または希釈剤の例として、水、生理食塩水、フィンガー溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。リポソームおよび固定油等の非水性媒体を使用してもよい。従来の媒質または薬剤が活性化合物と適合しないときを除いて、これらの組成物の使用が企図される。補助的な活性化合物もまた、組成物中に組み込むことができる。

10

20

30

【0192】

本発明の治療薬（および癌の治療のための任意の追加の治療薬）は、非経口、肺内、髄腔内および鼻腔内、ならびに必要に応じて、局所治療、病巣内投与を含む、任意の適切な手段により投与され得る。非経口注入として、例えば、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が挙げられる。投与は、任意の適切な経路により、例えば、静脈内または皮下注入等の注入により、投与が短期であるか、または長期であるかに部分的に依存して行うことができる。様々な時点に渡る単回または複数回投与、ボーラス投与、およびパルス注入を含むが、これらに限定されない様々な投与計画は、本明細書において企図される。

【0193】

癌治療薬を投与するための有効な投与量および計画は、経験的に決定されてよく、このような決定は、当該技術分野の範囲内である。単回または複数回投与が用いられてもよい。癌治療薬の生体内投与が用いられるとき、通常な投与量は、投与経路に応じて、1日当たり哺乳類の体重1kg当たり約10ng～最大100mg、好ましくは約1μg/kg/日～10mg/kg/日まで異なり得る。特定の投与量および送達方法に関するガイドンスは、文献において提供されており、例えば、米国特許第4,657,760号、第5,206,344号、または第5,225,212号を参照されたい。

【0194】

本発明の一態様は、本明細書に記載される体細胞変異のうちの1つ以上により特定される、HER3/ErbB3癌を有する個人を治療する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、有効な量のHER阻害剤を個人に投与するステップを含む。別の実施形態では、HER阻害剤は、HER受容体に結合する抗体である。好適な実施形態では、抗体は、ErbB3受容体に結合する。一実施形態では、HER抗体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、FuhらのWO10/108127に記載されるもの等のHER3および少なくとも1つの追加HER受容体に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む、多特異的抗体である。一実施形態では、HER阻害剤により治療されるErbB3癌は、HER3を発現する細胞を含む。一実施形態では、HER阻害剤により治療される癌は、胃癌、結腸癌、食道癌、直腸癌、盲腸癌、結腸直腸癌、非小細胞肺(NSCLC)腺癌、NSCLC(扁平上皮癌)、腎癌、黒色腫、卵巣癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌(SCLC)、肝細胞癌(HCC)、肺癌、および胰臓癌である。

40

50

【0195】

本発明の別の態様は、個人におけるHER受容体の生体活性を阻害する方法を提供し、有効な量のHER阻害剤を個人に投与することを含む。一実施形態では、HER受容体は、個人における癌細胞により発現されるHER3受容体である。別の実施形態では、HER阻害剤は、少なくともHER3に特異的に結合する抗原結合ドメインを含むHER抗体である。

【0196】

本発明の一態様は、薬剤として使用するためのHER抗体を提供する。本発明の一態様は、薬剤の製造において使用するためのHER抗体を提供する。薬剤は、一実施形態では、本明細書に記載される体細胞変異のうちの1つ以上により特定されるHer b B 3 / HER3癌を治療することができる。一実施形態では、薬剤は、HER3受容体の生体活性を阻害するためのものである。一実施形態では、HER抗体は、HER3、またはHER3および少なくとも1つの追加のHER受容体に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。

10

【0197】

別の態様では、本発明は、いくつかの異なる種類の治療の方法に適切なHER阻害剤を提供する。一実施形態では、HER阻害剤は、トラスツズマブ-ERBB2ドメインIVに結合する抗ERBB2；ペルツズマブ-ERBB2ドメインIIに結合し、二量体化を防ぐ抗ERBB2抗体；抗ERBB3.1-リガンド結合を遮断する（ドメインIIに結合する）抗ERBB3；抗ERBB3.2-ドメインIIに結合し、リガンド結合を遮断する抗ERBB3；MEHD7945A-リガンド結合を遮断する（EGFRおよびERBB3のドメインIIに結合する）二重ERBB3/EGFR抗体；ラバチニブ-二重ERBB2/EGFR低分子阻害剤；およびGDC-094148-PI3K阻害剤からなる群から選択される。

20

【0198】

別の態様では、本発明は、対象におけるEr b B 3癌を治療する方法において使用するための抗癌治療薬を提供し、該方法は、（i）対象から得られる生体試料においてEr b B 3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することであって、この変異が、（本明細書に記載される）Er b B 3アミノ酸配列の少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、変異の存在が、試料を得た対象における癌の存在を示すことと、（ii）核酸配列中に変異が検出される場合、有効な量の抗癌治療薬を対象に投与することと、を含む。

30

【0199】

併用療法

本方法において複合療法が用いられ得ることが企図される。併用療法として、2つ以上の癌治療薬の投与が挙げられるが、これに限定されない。治療薬の組み合わせでの投与は、典型的に、定義された期間に渡って行われる（通常、選択される組み合わせに応じて、数分、数時間、数日、または数週間）。併用療法は、これらの治療薬の連続様式での投与、つまり、各治療薬が異なる時点に投与される場合、ならびにこれらの治療薬または治療薬のうちの少なくとも2つの実質的に同時投与を包含することが意図される。

40

【0200】

治療薬は、同一経路または異なる経路により投与され得る。例えば、組み合わせでのEr b B拮抗薬は、静脈内注入により投与され得るが、組み合わせでの化学療法薬は、経口投与され得る。代替として、例えば、治療薬の両方は、経口投与され得るか、または両方の治療薬は、特定の治療薬に応じて、静脈内注入により投与され得る。治療薬が投与される配列もまた、特定の薬剤に応じて変化する。

【0201】

一態様では、本発明は、本明細書に記載される体細胞変異のうちの1つ以上により特定される、HER3 / Er b B 3癌を有する個人を治療する方法を提供し、この治疗方法は、複数のEr b B阻害剤を投与することを含む。一実施形態では、この方法は、Er b B

50

3 阻害剤、例えば、ErbB3拮抗薬、および少なくとも1つの追加のErbB阻害剤、例えば、EGFR、ErbB2、またはErbB4拮抗薬を投与することを含む。別の実施形態では、この方法は、ErbB3拮抗薬およびEGFR拮抗薬を投与することを含む。他の一実施形態では、この方法は、ErbB3拮抗薬およびErbB2拮抗薬を投与することを含む。さらに別の実施形態では、この方法は、ErbB3拮抗薬およびErbB4拮抗薬を投与することを含む。いくつかの実施形態では、ErbB拮抗薬のうちの少なくとも1つは、抗体である。別の実施形態では、ErbB拮抗薬のそれぞれは抗体である。

【0202】

キット

10

本明細書に記載されるか、または示唆される適用における使用のために、キットまたは製造物品も提供される。このようなキットは、バイアル瓶、管等の1つ以上の容器手段を受容して厳重に封じ込めるように区画化されているキャリア手段を含んでよく、容器手段のそれぞれは、本方法において使用される分離要素のうちの1つを含む。例えば、容器手段のうちの1つは、検出可能に標識されるか、または標識することができるプローブを備え得る。このようなプローブは、本明細書に開示される癌と関連付けられるErbB3体細胞変異を含むポリヌクレオチドに特異的なポリヌクレオチドであり得る。このキットが、標的核酸を検出するために核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合、キットは、標的核酸配列の增幅のためのヌクレオチド（複数可）を含む容器、および／またはレポーター手段、例えば、酵素、蛍光、または放射性同位元素標識等のレポーター分子に結合される、アビジンまたはストレプトアビジン等のビオチン結合タンパク質を含む容器も有し得る。一実施形態では、本発明のキットは、本明細書に記載される1つ以上のErbB3癌検出薬を含む。好適な実施形態では、キットは、本明細書に記載される、1つ以上のErbB3消化管癌検出薬または1つ以上のErbB3肺癌検出薬を含む。別の実施形態では、キットは、本明細書に記載される、治療薬（例えば、ErbB3阻害剤）を含む。

20

【0203】

他の実施形態では、キットは、本明細書に開示される癌と関連付けられるErbB3体細胞変異を含むポリペプチドを検出することができる標識薬を含み得る。このような薬剤は、ポリペプチドに結合する抗体であり得る。このような薬剤は、ポリペプチドに結合するペプチドであり得る。キットは、例えば、本明細書に開示される遺伝子変異体を含むポリペプチドに結合する第1の抗体（例えば、固体支持体に付着した）、および任意選択により、ポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかに結合し、検出可能な標識に共役される第2の異なる抗体を含み得る。

30

【0204】

キットは、典型的に、上記の容器、および緩衝液、希釈剤、フィルター、針、カテーテル、シリンジ、および使用のための指示書を有するパッケージ挿入物を含む、商業的およびユーザの立場から望ましい材料を含む1つ以上の他の容器を含む。組成物が特定の治療または非治療適用に使用されることを示すために、ラベルが容器上に存在してよく、上記のもの等の生体内または生体外使用のいずれかについて指示を示してもよい。キット中の他の任意の成分としては、1つ以上の緩衝剤（例えば、ロック緩衝剤、洗浄緩衝剤、基質緩衝剤等）、酵素標識により化学的に変化される、基質等の他の試薬（例えば、クロモゲン）、エピトープ抽出溶液、対照試料（陽性および／または陰性対照）、対象スライド（複数可）等が挙げられる。

40

【0205】

別の態様では、本発明は、対象における癌を検出するためのキットの製造において、ErbB3癌検出薬の使用を提供する。一の実施形態では、対象から得られる生体試料においてErbB3をコードする核酸配列中のアミノ酸変異の存在または不在を検出することを含み、この変異は、（本明細書に記載される）ErbB3アミノ酸配列の少なくとも1つの位置にアミノ酸変化をもたらし、変異の存在は、試料が得られた対象における癌の存在を示す。

50

【0206】

マーケティングの方法

本明細書における発明は、癌の診断または予後診断の開示される方法をマーケティングするための方法も包含し、開示される方法の使用をターゲットオーディエンスに宣伝、指示、および／または特定化することを含む。

【0207】

マーケティングは、概して、スポンサーが特定され、メッセージが制御される非個人的な媒体を介する有料通信である。本明細書における目的で、マーケティングとしては、公告、広報、プロダクトプレイスメント、資金提供、引受業務等が挙げられる。この用語は、印刷通信媒体のいずれかに出現する資金提供された情報公示も含む。

10

【0208】

本明細書における診断方法のマーケティングは、任意の手段により達成され得る。これらのメッセージを送達するために使用されるマーケティング媒体の例としては、テレビ、ラジオ、映画、雑誌、新聞、インターネット、および掲示板が挙げられ、放送媒体に出現するメッセージであるコマーシャルを含む。

【0209】

使用されるマーケティングの種類は、多くの因子、例えば、病院、保険会社、診療所、医師、看護婦、および患者等の対象となるターゲットオーディエンス、ならびに費用考慮および薬剤および診断のマーケティングを規制する関連管轄法に依存する。マーケティングは、サービスインタラクションおよび／またはユーザの人工統計および地理的場所等の他のデータにより定義されるユーザの特徴に基づいて個別化またはカスタマイズされ得る。

20

【0210】

以下の実施例は、説明するためだけに提供され、本発明の範囲をいかようにも限定するよう意図されない。

【0211】

本明細書に引用される全ての患者および参考文献は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【実施例】

【0212】

30

実施例 - ヒト癌における腫瘍形成 E R B B 3

ヒト癌におけるE R B B 3の重要性を考慮して、ヒト癌について組織的に調査し、再発する体細胞変異を特定し、これらの変異が形質転換することも示す。さらに、癌のE R B B 3変異体駆動型動物モデルにおける標的治療薬を評価し、それらの大部分が、E R B B 3変異体駆動型腫瘍形成を遮断する際に有効であることを示す。

【0213】

材料および方法腫瘍DNA、変異、およびゲノム増幅

適切に承諾された一次ヒト腫瘍試料は、市販の供給源から得た（図1）。この研究において使用されるヒト組織試料は、使用前に非識別化（二重コード化）されたため、これらの試料を使用する研究は、米国保健社会福祉省規則および関連ガイダンス（45 CFR

40

Part 46）の下で、ヒト対象研究として考慮されない。使用される全ての腫瘍中の腫瘍含有量は、病理学レビューにより70%未満であることが確認された。腫瘍DNAは、Qiagen Tissue簡易キット（Qiagen, CA）を使用して抽出した。E R B B 3の全てのコーディングエキソンは、以下の表1に列挙されるプライマーを使用して増幅した（Applied Biosystems, CA）。PCR製品は、外側対および内側対の2つのプライマー対を使用して生成し（表1）、標準PCR条件を使用して、3730×1 ABIシーケンサーを使用して配列決定した。配列決定データは、dbSNPデータベースに存在しない変異体の存在について、Mutation Surveyor（Softgenetics, PA）および追加の自動化配列整列プログラム

50

を使用して分析した。特定される推定変異体は、元の腫瘍DNAのDNA配列決定または質量分析（Sequence, CA）により確認した後、腫瘍DNAに適用される類似のプロセスにより隣接したマッチ正常DNAにおけるその不在を確認した。代表的な正常ERBB3核酸およびアミノ酸配列は、図2および3にそれぞれ提供される。

表 1-PCR および配列決定に使用されるプライマー

エクソン	標的 ID	5p 外部プライマー	3p 外部プライマー	5p 内部プライマー(F)	3p 内部プライマー(F)	配列決定プライマー
1	DNA519201	TCCTCTGCCATCC	CCGGAGCTGACC	CGGGCGCTGACT	AATGCCGCGCTCG	F & R
2	DNA519202	GCCCCACTACAGCTT	TCCCAAGATGACAGCC	AGAAGAGAAGACTCTC	TACAACAGAGACCATAG	F & R
3	DNA519203	CGGTAACTCCGCTCTA	GGCCCTCTATTGCTTAG	AGATCGCACTATTGACTC	TAGCTCCCTACTG	F & R
4	DNA519204	CTCCCTCATCTTAAAGGG	TGTTTAGATTCCAGGAGA	CTGGACAGGTGACTGA	CTGCTCCCTTTCTTGAACA	F & R
5	DNA519205	CGCCCTTGTGACA	CACTGAGGACACAGAT	CTGGGTTGGACTAG	GGCCCAAAGCAGTGA	F & R
6	DNA519206	ATCAGAAAGACTGCCAGA	TGTGGACAGCGAGGT	TTGCAAGGGCGATG	AGCTGAAAGTTAGCTTG	F & R
7	DNA519207	CCAGTGCCTGCATGAT	GGAGGACTGGACAGTA	GGTGTCTCAGTGTA	TGTGATGCTGAAGTCAT	F & R
8	DNA519208	CAAATAGTGAAGAGACTTTGAAT	ATCTTGGTGAAGTCACAA	CTTACTCTGCTCTTGTA	AAGTCCAGGTGCCCC	F & R
9	DNA519209	CTGTCCCTGCCAGAAGA	ATGGAGGATGTTAAGCA	GATCAACACATCTGTGC	GATGTTCTGAGGGAA	F & R
10	DNA519210	CTTGTGTTGACAAGATGCT	GACTGGAGTTTCAAGTA	CCCTTAATTCTTGTGCTTG	ACACTGAAGTTGTGCACTG	F & R
11	DNA519211	TCACAGGGTGAATGGC	GATCCACTGAGGGG	GTCTTCGGAGACATAC	GAAATTGCTCAGTGCTGAT	F & R
12	DNA519212	CCTCAAAACAAAGGGTTT	AGGACTCCAGAAG	CACTGCTCATACGCA	GGAGAGGAGCTGAG	F & R
13	DNA519213	AGGGTCTGTAAGTTG	CCAAGTCCTGACCTTC	CAGAGACTGGGTGA	TCCCTGTAGTGGGA	F & R
14	DNA519214	CAAGTCAGGATGGGTG	TCCCAAGGTCAATTCCATA	CTTTCTGAATGGGTACAGTA	GTCAAGGAGAATCAGTC	F & R
15	DNA519215	TGGAGCATCTGGGA	CACCCACCTCGC	GATCTCAAGGAAAC	F & R	
16	DNA519216	TCAAGGATGACTCACAGAA	CAGTCTAGACTGAAAG	GACCTCAAGGAAAC	GACCAACCTAAATCTG	F & R
17	DNA517682	CTTTCAGTAGCTAAGCTG	ACACACTACTCCCTTG	GCTTCTGAGCTTCCC	CCAGTGTCTCTAGGG	F & R
18	DNA517683	CAGGGCTGTGACCTC	TGCAAGCTGGATCTTGAT	GCACAAATAAACCTCTCAGTT	CGTCCCAACTCTGTGTC	F & R
19	DNA517684	GAAGCTTAAGTGTCTGG	GAACACCAACAGGTTACA	CTTCAAAGAGACAGGTTAA	TAAGAGACACAAAAGGTATTATCT	F & R
20	DNA517685	GGAGAGGAGACAATTAG	CGCTCACATGCTCTG	AAGGAATTCTGTATGCCG	CTTCACTCGCTTGC	F & R
21	DNA517686	CCCAAAACCAACCCCTC	CCAGTCCCAAGGTTCTTG	AAGGATCTAGGTGTGC	GGGTGAGCCACCCG	F & R
22	DNA517687	AGAGCGAGACTCCGT	CTGTACACCTGTTGC	CACTGACTCCAGTCT	CCAGGGGTCACTAACCTC	F, R & R1
23	DNA517688	GATGCCCTCTCTCA	CAGCCTGGTGAACAT	CTGGAGCTATGGTCAGT	CCAAGATTTGATGGCAC	F, F1 & R
24	DNA517689	AGATGGGTTCACTATGT	CTCTACTCTCTAGCTT	AGATAGCTGGACTTTAG	GTCTAGTCTAGTTCTG	F & R
25	DNA519217	GCCCAAACCTTAAAGAAC	TGATGGACTAAAGGCTC	GTGGATGATGTTGAGAAC	AAGATAACCTGGTTCATG	F & R
26	DNA519218	GCCTACCAAGTGGAAC	CCTCAGGTGATCCACT	CAACCAACCAACTG	ATTACAGGTGTGCACCA	F & R
27a	DNA519219_1	GGCAGTGAACACCCA	ATAACCGTTGACATCCTC	GTGTGATCTGGCATGA	F, R & R2	
27b	DNA519219_2	CGTCCAGTCCTCTACA	GAGGGAGGAGTACCT	CAGAACTGAGACCCAC	F & R	
28a	DNA519220_1	CITCAAAGGTGCTGAC	CCCTGAAAGACTCTC	CATGCAGATACACCC	F & R	
28b	DNA519220_2	CTTGAGGAGCTGGGTT	GTCAAATGTTAAAAGCTC	GGGGGGATAATGGA		
				TACATACCATAAAGAATTGTGTC		F & R

F1 = TCACTGGCCCAAGT; R1 = GCAGGAAGACATGGACT; R2 = CTCTTCCTCTAACCCG

表 1 は、「5p 外側プライマー」配列を配列番号 3 ~ 3 2 として、「3p 外側プライマー」配列を配列番号 3 3 ~ 6 2 として、「5p 内側プライマー」配列を配列番号 6 3 ~ 9 2 として、「3p 内側プライマー」配列を配列番号 9 3 ~ 1 2 2 として、「F 1」、「R 1」、および「R 2」配列を配列番号 1 2 3 ~ 1 2 5 として、全てそれぞれ出現順に開示する。

は、ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA) から購入した。BaF3細胞は、10% (v/c) ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher Scientific, IL)、2 mM Lグルタミン、100 U/mL ペニシリン、100 mg/mL ストレプトマイシン (完全 RPMI)、および 2 ng/mL マウス IL-3 を補充した RPMI 1640 中で維持した。MCF10A細胞は、5% (v/v) ウマ血清、0.5 µg/mL ヒドロコルチゾン、100 ng/mL コレラ毒、10 µg/mL インスリン、20 ng/mL EGF、2 mM Lグルタミン、100 U/mL ペニシリン、および 100 mg/mL ストレプトマイシンを補充した DMEM : F12 中で維持した。

【0215】

10

プラスミドおよび抗体

レトロウイルスベクター、pRetro-IREs-GFP (Jaiswal, B. S. et al. Cancer Cell 16, 463-474 (2009)) を使用して、c末端FLAGタグ付ERBB3 野生型および変異体を安定的に発現した。この研究で使用されるERBB3変異体はQuickChange 部位特異的突然変異誘発キット (Stratagene, CA) を使用して生成した。ERBB2を用いて以前に行われたとおり、天然分泌シグナル配列を除去した後、糖タンパク質D (gD) N末端タグまたはgDコーディング配列に溶融されたEGFR単純ヘルペスシグナル配列を持つ完全長ERNN2を発現するレトロウイルス構成は、pLPCXレトロウイルスベクターを使用して発現した (Clontech, CA) (Schaefer et al. J Biol Chem 274, 859-866 (1999))。

20

【0216】

ウェスタンプロットの場合、pERBB3 (1289)、pEGFR (Y1068)、pRTBB2 (T1221/2)、pAKT (Ser473)、pMAPK、総MAPK およびAKT (Cell Signaling Technology, MA)、gD (Genentech Inc, CA)、-アクチンおよびFLAG M2 (Sigma Life Science, MO)、およびHRP共役二次抗体 (Pierce Biotechnology, IL) を認識する抗体をこの研究に使用した。

【0217】

30

安定した細胞株の生成

野生型または変異体ERBB3FLAG および gD-EGFR または gD ERBB2 をコードするレトロウイルス構成体を、Fugene 6 (Roche, Basal) を使用して、Phenix 両性細胞にトランスフェクトした。次に得られるウイルスを、BaF3 または MCF10A 細胞のいずれかに形質導入した。レトロウイルス IRES 駆動型 GFP の発現に基づいて、いずれかの空ベクター、野生型、または ERBB3 変異体レトロウイルス感染した細胞の上位 10% は、フローサイトメトリーにより無菌分類し、ウェスタンプロットによりタンパク質の発現について特性化した。EGFR または ERBB2 と一緒に ERBB3 変異体を発現する安定株を生成するために、FACS 分類された ERBB3 野生型または変異体発現細胞を、野生型 EGFR または ERBB2 ウィルスのいずれかに感染させた。次に、感染した細胞を、1 µg/mL ピューロマイシンを用いて 7 日間選択した。次に、これらの細胞のプールさらなる研究に使用した。

40

【0218】

生存および増殖アッセイ

野生型および変異体ERBB3を安定的に発現するBaF3細胞を単独で、またはEGFRもしくはERBB2と一緒に、PBS 中で 2 回洗浄し、IL3 を含まない完全 RPMI 培地中、8 個の複製で 3 × 96 ウェルプレートに置いた。次に、必要に応じて、異なる濃度のNRG1 および抗NRG1 抗体または異なるERBB 抗体、チロシンキナーゼ、またはPI3K 低分子阻害剤を用いて細胞を処置し、生存または細胞増殖に対するこれらの効果を試験し、関連を図面に表した。0 時間および 120 時間にわたり、生きた細胞を、Cell Titer-Glo 発光細胞生存キット (Promega Corp., WI

50

) および Synergy 2 (Bioteck Instrument , CA) を使用して決定した。細胞番号値の全てを、0 時間の値に対して正規化した。ERBB3 - WT を安定的に発現する MCF10A の増殖を評価するために、変異体を PBS 中で 2 回洗浄し、5000 個の細胞を、3 通の無血清培地中、8 個の複製で 96 ウエルプレートに置き、5 日間増幅させた。細胞番号は、発光細胞生存キットを使用して、0 日目および 5 日目に測定した。提示されたデータは、0 日目に対して 5 日目の生存の平均 ± 標準誤差を示す。平均および統計的有意性は、GraphPad V ソフトウェア (GraphPad , CA) を使用して決定した。

【 0219 】

免疫沈降およびウェスタンプロット

細胞表面上で発現したヘテロ二量体 ERBB3 - ERBB2 受容体錯体のレベルを評価するために、免疫沈降の前に、膜不透過性架橋剤ビス (スルホスクシニミジル) 基質 (BS3) (Thermo scientific , IL) を使用して、細胞表面タンパク質を架橋した。リガンド (NRG1) 処置したか、処置していない BaF3 細胞を、冷たい 50 mM HEPES pH 7.5 中で 2 回洗浄し、150 mM NaCl を、1 mM BS3 を用いて、HEPES 緩衝剤中で 60 分間 4 °C で処置した。50 mM Tris - C1 および 150 mM NaCl 、 pH 7.5 を用いて 2 回細胞を洗浄することにより、架橋を停止させた。次に、溶解緩衝液 I 中で細胞を溶解した (50 mM Tris HCl pH 7.5 、 150 mM NaCl 、 1 mM EDTA 、 1% Triton X-100) 。免疫沈降の場合、浄化溶解物を、一晩 4 °C で、抗 FLAG - M2 抗体連結尾 0 図 (Sigma , MO) でインキュベートした。FLAG ビーズを、溶解緩衝液 I を使用して 3 回洗浄した。ビーズ上に残留する免疫沈降タンパク質を、SDS - PAGE 負荷緩衝液中で沸騰させ、4 ~ 12% SDS - PAGE (Invitrogen , CA) 上で溶解し、ニトロセルロース膜の上に移した。免疫沈降タンパク質または溶解物からのタンパク質を、適切な一次 HRP 共役二次抗体、および化学発光 Super signal West Dura 化学発光検出基質 (Thermo Fisher Scientific , IL) を使用して検出した。

【 0220 】

ウェスタンプロット研究の場合、MCF10A 細胞を血清飢餓させ、EGF または NGF の不在下で増殖させた。同様に、ERBB 受容体および下流シグナル伝達成分の状態を、IL-3 の不在下で増殖させた BaF3 細胞中で評価した。

【 0221 】

近接結紮アッセイ

野生型または P262H 、 G284R 、および Q809R ERBB3 変異体を ERBB2 と一緒に安定した発現する BaF3 細胞株を、準培養密度に増殖させた。細胞を PBS で 2 回洗浄し、 IL3 を含まない RPMI 培地中で一晩インキュベートした。これらの細胞のサイトスピン調製物を作製し、空気乾燥させて、 4% パラホルムアルデヒドで 15 分間固定した後、 PBS 中 0.05% Triton を用いて 10 分間透過させた。 Duolink 遮断溶液 (Soderberget al. Nat Methods 3 , 995-1000 (2006)) を用いて 60 分間遮断した後、抗 FLAG (ウサギ) および抗 gD (マウス) または抗 ERBB3 (マウス) (Labvision , CA) および抗 ERBB2 (ウサギ) (Dako , Denmark) 抗体のいずれかを用いて、 1 時間室温で細胞をインキュベートした。 Duolink 抗ウサギ + および抗マウス - PLA プローブ、および Duolink II 検出試薬 (Uppsala , Sweden) 遠赤を使用して、製造者のプロトコルに従って Duolink 染色を行った (Soderberget al. Nat Methods 3 , 995-1000 (2006)) 。 Axio plan 2 、 Zeiss 顕微鏡、および DAPI / Texas red に適切なフィルターを使用して、 63 倍対物レンズで画像取得を行った。シグナルの定量測定の場合、ユーザ定義された閾値を適用した後、 Duolink 画像ツールソフトウェアを用いて、 tiff 画像ファイルを分析した。

10

20

30

40

50

【0222】

コロニー形成アッセイ

E G F R (2×10^5) または E R B B 2 (50,000) を安定的に発現する B a F 3 細胞を、 E R B B 3 野生型または変異体と一緒に、 2 m L の I L 3 を含まないメチルセルロース (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s , C a n a d a) と混合し、 6 ウェルプレートの上に置き、指示されるときは、置く前に、異なる E R B B 抗体またはチロシンキナーゼまたは P I 3 K 低分子阻害剤を用いて細胞を処置した。次に、プレートを 37 で 2 週間インキュベートした。 M C F 1 0 A コロニー形成の場合、 E R B B 3 - W T または変異体を、単独で、または E G F R または E R B B 2 との組み合わせで安定的に発現する 20,000 個の M C F 1 0 A 細胞は、 D M E M : F 1 2 欠損血清、 E G F 、および N R G 1 中の 0.35% 寒天と混合し、 0.5% ベース寒天上に置いた。次に、プレートを 37 で 3 週間インキュベートした。コロニーの存在は、 G e l カウント撮像装置 (O x f o r d O p t r o n i x L t d , U K) を使用して評価した。各プレート中のコロニーの数を、 G e l カウントソフトウェア (O x f o r d O p t r o n i x L t d , U K) を使用して定量化した。

10

【0223】

3 次元形態形成または腺房形成アッセイ

野生型および変異体 E R B B 3 を安定的に発現する M C F 1 0 A 細胞を単独で、または E G F R もしくは E R B B 2 のいずれかと一緒に、既に記載されているプロトコルに従って、 8 ウェルチャンバスライド中の増殖因子還元マトリゲル (B D B i o s c i e n c e s , C A) 上に播種した (D e b n a t h e t a l . M e t h o d s 3 0 , 2 5 6 - 2 6 8 (2 0 0 3)) 。腺房の形態形成を、 10 倍対物レンズを使用する Z e i s s 顕微鏡を使用して、 12 ~ 15 日目に撮影する。

20

【0224】

13 日目の 3 D 培地の完全抽出、固定、および免疫染色は、以前に記載されるとおり行った (L e e e t a l . N a t M e t h o d s 4 , 3 5 9 - 3 6 5 (2 0 0 7)) 。手短に言うと、抽出後、腺房をメタノール - アセトン (1 : 1) で固定し、ラット抗 - 6 インテグリン (M i l l i p o r e , B i l l e r i c a M A) 、ウサギ抗 K i 6 7 (V e c t o r L a b s , B u r l i n g a m e , C A) 、および D A P I で染色した。ヤギ抗ラット A l e x a F l u o r 6 4 7 (I n v i t r o g e n , C A) およびヤギ抗ウサギ A l e x a F l u o r 5 3 2 (I n v i t r o g e n , C A) 二次抗体をこの研究に使用した。 40 × 油浸漬対物レンズを用いて、 L e i c a S P E 共焦点顕微鏡を使用して共焦点像を行った。

30

【0225】

トランスウェル移行研究

空ベクターを安定的に発現する M C F - 1 0 A 細胞、野生型 E R B B 3 、または E R B 3 の様々な変異体 (50,000 細胞) を、 8 μ m トランスウェル移行チャンバー (C o r n i n g , # 3 4 2 2) の上に播種した。無血清アッセイ培地で 20 時間細胞を移行させた。綿棒を使用して膜の上部分の細胞をこすり取り、移行した細胞を 3.7% (v / v) パラホルムアルデヒド中で固定し、 0.1% クリスタルバイオレットで染色した。全てのトランスウェルから、 20 倍の拡大で位相差顕微鏡下、 5 つの異なるフィールドから画像を撮影し、移行した細胞の数をカウントした。得られた数もまた、 H o e c h s t 染料により核を染色することにより検証した。 E R B B 3 変異体発現細胞中で観測される移行の倍率増加を、野生型 E R B B 3 発現細胞と比較して計算し、プリズムパッドソフトウェアを用いてスチュードントの t 検定を行い、その有意性を検査した。

40

【0226】

動物研究

E R B B 2 と一緒に E R B B 3 野生型または変異体を発現する B a F 3 細胞 (2×10^6) を、尾静脈注入により 8 ~ 12 週齢の B a l b / C ヌードマウスに埋め込んだ。生体内抗体有効性研究の場合、マウスを、 40 m g / k g Q W 抗ブタクサ (対照) 、 10 m g

50

/ kg QWトランスツズマブ、50 mg / kg QW抗ERBB3.1、および100 mg / kg QW抗ERBB3.2を用いて、細胞移植後4日目から治療した。治療につき合計13匹の動物に注入した。この10匹のマウスの生存を追跡し、うち3匹を20日目に剖検に使用して、骨髓、脾臓、および肝臓の組織学的分析により疾患の進行を評価した。これらの動物から得られる骨髓および脾臓単一細胞懸濁液も、FACS分析によりGFP陽性BaF3細胞の存在および比率について分析した。可能な場合、生存研究において死亡した動物または瀕死の動物を解剖して、死因を確認した。脾臓、肝臓、および骨髓の形態学的および組織学的分析も、これらの動物に対して行った。骨髓、脾臓、および肝臓を、10%中性緩衝ホルマリン中に固定した後、自動化組織プロセッサ(TissueTek, CA)内で処理し、パラフィンに埋め込んだ。4ミクロン厚区分をH&E(Sigma, MO)で染色し、浸潤する腫瘍細胞の存在について組織学的に分析した。Nikon DS-Rカメラを用いて、Nikon 80i複合顕微鏡上で組織構造の写真を撮影した。全ての動物研究は、Genentechの研究機関の動物管理使用委員会(IAUC)承認されたプロトコルの下で行った。

10

【0227】

統計分析

提示されるエラーバーは、平均±標準誤差を表す。スチューデントのt検定(両側)を統計分析に使用して、GraphPad Prism 5.00(GraphPad Software, San Diego, CA)を使用する治療群と比較した。0.05未満のP値は、統計的に有意であると考慮した(*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001)。生存分析のカプラン-マイヤー法の場合、ログランク統計を使用して、生存の差を検査した。

20

【0228】

結果

ERBB3変異の特定

マッチした正常試料と一緒に、70個の一次結腸腫瘍の全エキソーム配列決定を行う際に、ERBB3中の体細胞変異を特定した(Seshagiri, S. et al. Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (Manuscript in Preparation 2011))。ヒト固体腫瘍におけるERBB3変異の普及をさらに理解するために、ERBB3のコーディングエキソンを、102(全エキソームスクリーニングからの70試料(Seshagiri, S. et al. Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (Manuscript in Preparation 2011))および32追加結腸試料)結腸直腸癌、92胃癌、74非小細胞肺(NSCLC)腺癌(アデノ)、67NSCLC(扁平上皮癌)、45腎癌、37黒色腫、32卵巣癌、16肺大細胞癌、15食道癌、12小細胞肺癌(SCLC)、11肝細胞癌(HCC)、および9他の癌[4肺癌(その他)、2盲腸癌、1肺癌(神経内分泌)、1脾臓癌、および1直腸癌]からなる合計512のヒト一次腫瘍試料中で配列決定した(図1)。胃癌の12%(11/92)、結腸癌の11%(11/102)、NSCLCの1%(アデノ、1/74)、およびNSCLCの1%(扁平上皮、1/67)においてERBB3変異を変化させるタンパク質を発見した(図4)。以前の研究は、NSCLC(扁平上皮、0.5%[3/188])、膠芽腫(1%[1/91])、ホルモン陽性乳癌(5%[3/65])、結腸癌(1%[1/100])、卵巣癌(1%[3/339])、および頭頸部癌(1%[1/74])において、ERBB3変異を変化させる散発性タンパク質を報告しているが、再発変異について報告されておらず、癌におけるこれらの変異の機能的関連も評価されていない(図4、および表2、3)。追加の配列決定および質量分析を介して、元の腫瘍DNAにおけるそれらの存在およびマッチした隣接する正常組織における不在について検査

30

40

50

することにより、この研究で報告された全ての変異は、体細胞性であることを確認した。ミスセンス変異に加えて、3つの同義的（非タンパク質変化）変異も発見し、それぞれ結腸癌、胃癌、および卵巣がんにおける変異である。さらに、結腸腫瘍では、RNA配列データを使用して、(Seshagiri, S. et al. Comprehensive analysis of colon cancer genomes identifies recurrent mutations and R-spondin fusions. (Manuscript in Preparation 2011))、これらの試料中のERBB3変異体の発現およびERBB2の発現を確認した（図5）。

【0229】

変異の大部分は、一部はERBB3のキナーゼドメインおよび細胞内尾部にマップされるが、主にECD領域内に集合した。興味深いことに、ECD変異体の中で4つの位置V104、A232、P262、およびG284は、複数の試料に渡って再発置換を含み、これらが変異多発点であることを示す。分析で特定された4つのECD多発点位置のうち2つV104およびG284は、それぞれ卵巣および肺（腺癌）試料において変異したことが以前に報告されている（Greenman et al. Nature 446, 153-158 (2007)、Ding et al. Nature 455, 1069-1075 (2008)）。さらに、多発点位置のそれぞれにおける再発ミスセンス置換の大部分は、これらの変異の潜在的なドライバーの役割を示す同一のアミノ酸変化をもたらした。データを結腸癌に関して以前に公開された単一ERBB3変異と組み合わせたとき、キナーゼドメインにおける多発点変異、S846Iも特定した（Jeong et al. International Journal of Cancer 119, 2986-2987 (2006)）。

【0230】

興味深いことには、特定された変異残基の大部分は、ERBB3相同分子種を越えて保存され（図6に示される、ならびにC. luppus（配列番号のXP_538226.2）配列）、残基の一部は、ERBBファミリーメンバー間で保存され、これらの変異が機能的効果を有する可能性があることをさらに示唆する。

10

20

表2-ERBB3 体細胞変異

ENTREZ 遺伝子ID	HUGO 遺 伝子記号	変異の種類	変異の影響	変異の位置	染色体	ストラ ンド	ゲノムスクレーノング終了位置*	参考配列版写ID	ヌクレオチド 変化	AA_Chge	タンパク質ドメイン	COSMIC_試料ID	疾患カテゴリ---
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56477631	56477631	NM_001982.2	372T>A	60M>K	Reco L ドメイン PF01030.15	96391	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56478954	56478954	NM_001982.2	104V>I	503G>T	Reco L ドメイン PF01030.15	86336	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56478954	56478954	NM_001982.2	104V>M	503G>A	Reco L ドメイン PF01030.15	96445	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56478954	56478954	NM_001982.2	104V>N	503G>S	Reco L ドメイン PF01030.15	20710	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481390	56481390	NM_001982.2	770C>T	19R>Q	Reco L ドメイン PF00757.11	95735	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481660	56481660	NM_001982.2	888C>T	232A>V	Reco L ドメイン PF00757.11	94200	胃癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481836	56481836	NM_001982.2	977C>T	262P>S	Reco L ドメイン PF00757.11	96157	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481857	56481857	NM_001982.2	978C>A	262P>H	Reco L ドメイン PF00757.11	101592	胃癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>C	284G>S	Reco L ドメイン PF00757.11	94592	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56481922	56481922	NM_001982.2	1043G>T	284G>W	Reco L ドメイン PF00757.11	96562	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56482336	56482336	NM_001982.2	1077T>C	295V>A	Reco L ドメイン PF00757.11	96737	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56482425	56482425	NM_001982.2	1166G>A	325G>R	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	非同義 コードイング	12	+	56482425	56482425	NM_001982.2	1166G>A	325G>A	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>C	284G>S	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>T	284G>W	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>A	284G>R	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>C	284G>S	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56483152	56483152	NM_001982.2	1043G>T	284G>W	Reco L ドメイン PF00757.11	96115	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487150	56487150	NM_001982.2	1489C>T	432I>T	Reco L ドメイン PF01030.15	98204	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487150	56487150	NM_001982.2	1489C>T	492D>H	Reco L ドメイン PF01030.3	100695	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487268	56487268	NM_001982.2	1801G>A	233G>A	Reco L ドメイン PF00691.16	90574	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487268	56487268	NM_001982.2	1801G>C	233G>S	Reco L ドメイン PF00691.16	86582	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56490371	56490371	NM_001982.2	2619A>G	805Q>R	Reco L ドメイン PF00691.16	101592	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56490980	56490980	NM_001982.2	2730G>T	846S>R	Reco L ドメイン PF00691.16	101763	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56491645	56491645	NM_001982.2	3683A>G	1164T>A	Reco L ドメイン PF00691.16	95504	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56491645	56491645	NM_001982.2	3683A>G	1421I>A	Reco L ドメイン PF00691.16	94210	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56491645	56491645	NM_001982.2	3683A>G	1667G>C	Reco L ドメイン PF00691.16	90574	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56491675	56491675	NM_001982.2	536I>A	233G>A	Reco L ドメイン PF00691.16	86582	非小細胞肺癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	564930271	564930271	NM_001982.2	714V>M	233G>A	Reco L ドメイン PF00691.16	101592	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56493080	56493080	NM_001982.2	805Q>R	233G>A	Reco L ドメイン PF00691.16	101763	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56493133	56493133	NM_001982.2	846S>R	2730G>T	Reco L ドメイン PF00691.16	95504	結腸直腸癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56495713	56495713	NM_001982.2	1301Q>Q	405G>A	Reco L ドメイン PF00691.16	94210	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56478854	56478854	NM_001982.2	503G>A	104V>M	Reco L ドメイン PF00691.16	98988	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56478876	56478876	NM_001982.2	525A>G	111Y>C	Reco L ドメイン PF00691.16	94271	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56478948	56478948	NM_001982.2	597D>T	135R>L	Reco L ドメイン PF00691.16	94128	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56481660	56481660	NM_001982.2	888C>T	232A>V	Reco L ドメイン PF00691.16	94117	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56486803	56486803	NM_001982.2	1410T>C	406G>T	Reco L ドメイン PF00691.16	94117	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487212	56487212	NM_001982.2	151G>A	453R>H	Reco L ドメイン PF00691.16	94255	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56487260	56487260	NM_001982.2	1666G>T	498R>I	Reco L ドメイン PF00691.16	94137	胃癌
2055	ERBB3	置換	同義 コードイング	12	+	56494908	56494908	NM_001982.2	1089R>W	3458C>T	Reco L ドメイン PF00691.16	92177	胃癌

*ページ: NCBIR37に基づくゲノム位置
WES: 全エキソーム配列決定

表3-ヒト癌における公表 *ERBB3* 変異

組織診断	変異体数	試料数	頻度%	変異(アミノ酸変化)	参照文献
1 乳癌 (HR+)	3	65	4.62	Q281H, T389R, E928G	Nature (2010) 466: 869
2 NS CLC (腺癌)	3	188	1.60	G69R, G284R, Q298*	Nature (2008) 455: 1069
3 膜芽細胞癌	1	91	1.10	S1046N	Nature (2008) 455: 1061
4 卵巣	3	339	0.88	V104M, V438I, D1149E	Nature (2007) 446: 153 [23 sample (23 +316)]
5 結腸	1	100	1.00	S846I	Int J of Ca (2006) 119: 2986
6 頭頸部癌	1	74	1.35	M90I	Science (2011) - Epub date 2011/07/30

【0231】

変異についてさらに理解するために、公開された *ERBB3* ECD⁷ およびキナーゼドメイン (Jura et al. Proceedings of the National Academy of Sciences 106, 21608 - 21613 (2009)、Shiet al. Proceedings of the National Academy of Science 107, 7692 - 7697 (2010)) 結晶構造 (図7および図8) にそれらをマッピングした。興味深いことに、V104、A232、およびG284での多発点変異は、ドメインI/Iインターフェース内に集合する。ドメインIIとIIIとの間のインターフェースにおけるこれら3つの部位の集合は、それらが共通機序により作動し得ることを示唆する。ドメインIIは、脊椎動物のように配列されたいくつかの高システインモジュールを含む。これらの半非依存性特徴の中で、関係のわずかな変化には、ファミリーメンバー間で機能的重要性が割り当てられている。(Alvarado et al. Nature 461, 287 - 291 (2009))。V104/A232/G284変異は、これらのモジュールのうちの1つ以上を移動させ、変化した表現型を生じ得る。P262での変異は、ドメインIIの基部にQ271に近接して存在し、繫留された閉じた構成に必要なドメインII/IV相互作用に関与する。残基809および846でのキナーゼドメイン変異は、エンドサイトーシスにおいて役割を与えられた区分である、EGFRキナーゼ構造内のC末端尾部により取られる経路に近接する位置に相同である。他の変異部位は、図8に現れる。

【0232】

ERBB3 変異体は、MCF10A 哺乳類上皮細胞のリガンド非依存性増殖を促進する。

MCF-10A 哺乳類上皮細胞は、増殖のためにEGFを必要とする (Soule, H. D. et al. Cancer Res 50, 6075 - 6086 (1990)、Petersen et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89, 9064 - 9068 (1992))。MCF10A 細胞中で発現するとき、腫瘍遺伝子は、それらをEGF非依存性にすることができる (Debnath et al. The Journal of cell biology 163, 315 - 326 (2003)、Muthuswamy et al. Nat Cell Biol 3, 785 - 792 (2001))。ERBB3変異の腫瘍形成性を理解するために、選択したERBB3変異体群が、細胞形質転換および増殖を支援する能力を検査した。4つのECD多発点変異体および2つの(V714MおよびQ809R)ERBB3キナーゼドメイン変異体を含む、6つの(V104M、A232V、P262H、P262S、G284R、およびT389K)ERBB3 ECD変異体を、それらの細胞増殖、シグナル伝達、腺房形成、アンカレッジ非依存性増殖、および移行について、MCF10A細胞中でそれらを安定的に発現することにより検査した。ERBBファミリーメンバーは、シグナル伝達および細胞形質転換においてヘテロ二量体として機能するため、それらを野生型(WT)EGFRまたはERBB2と共に発現させることにより、ERBB3変異体の機能効果も検査した。ERBB3変異体は、MCF10Aにおいて単独で発現するとき、外因性ERBB3リガンドNRG1またはEGFの不在下で、ERBB3-WTと比較して、リガンド非依存性増殖の非常にわずかな増加 (図9)、コロニー形成 (図10)、またはpERBB3、pAKT、およびpERKのようなシグナル伝達活性化状態マーカーの上昇 (図11A) を示した。しかしながら、EGFRまたはERBB2

10

20

30

40

50

との組み合わせでのERBB3変異体の発現は、ERBB3-WTと比較して、増殖およびコロニー形成の著しい増加を示した(図9および図10)。さらに、ERBB3変態の大部分は、EGFRまたはERBB2との組み合わせで、pERBB3、pAKT、およびpERKの上昇につながる(図11BおよびC)。

【0233】

MCF10A細胞は、再構成された3次元(3D)基底膜ゲル培地上で、EGFの存在下で培養されるとき、腺房細胞機能円体を形成する(Muthuswamy et al. Nat Cell Biol 3, 785-792 (2001)、Muthuswamy Breast Cancer Research 13, 103 (2011))。しかしながら、いくつかの腫瘍遺伝子の発現は、それらをEGF非依存性にし、複雑な多腺房構造ももたらす(Debnath et al. The Journal of cell biology 163, 315-326 (2003)、Brummer et al. Journal of Biological Chemistry 281, 626-637 (2005)、Bundy et al. Molecular Cancer 4, 43 (2005))。血清、EGF、およびNRG1を欠く3D培養研究において、ERBB3変異体の異所的発現は、EGFRまたはMCF10A細胞中のEGFRまたはERBB2との組み合わせで、ERBB3-WTをEGFRまたはERBB2と共に発現するMCF10A細胞と比較して、大きな腺房構造を促進した(図12A)。MCF10細胞を共発現するERBB3変異体/ERBB2に由来する腺房中のKi67の染色、増殖のマーカーは、検査した全ての変異体内の増殖の増加を示した(図12B)。さらに、ERBB3変異体/ERBB2のサブセットを発現する同一のMCF10A細胞は、ERBB3-WT/ERBB2細胞と比較して、移行の増加も示した(図12Cおよび図13A)。これらの結果を踏まえて、ERBB3変異体の腫瘍形成性質を確認する。

10

20

30

40

【0234】

ERBB3変異体は、結腸上皮細胞のアンカレッジ非依存性増殖を促進する。

IMCEは、腫瘍形成Rasの発現により形質転換され得る、不死化マウス結腸上皮細胞である(D'Abaco et al. (1996). Mol Cell Biol 16, 884-891、Whitehead et al. (1993). PNAS 90, 587-591)。IMCE細胞を使用して、ERBB3変異体を、ERBB3変異体を単独で、またはERBB2との組み合わせのいずれかで安定した発現させることにより、アンカレッジ非依存性増殖、シグナル伝達、および成体内腫瘍発生について検査した。図13B(a~b)に示されるように、ERBB3-WTまたは変異体は、それ自体が発現されるとき、アンカレッジ非依存性増殖を促進しないことが分かった。しかしながら、ERBB3変異体の大部分は、ERBB3-WTとは異なり、ERBB2と共に発現されるとき、アンカレッジ非依存性増殖を促進した(図13B(a~b))。観測されるアンカレッジ非依存性増殖と一致して、ERBB2と一緒にERBB3変異体を発現するIMCE細胞の大部分は、pERBB3および/またはpERBB2の上昇、ならびにpAKTおよび/またはpERKの同時増加を示した(図13B(c~d))。ERBB3変異体の一部は、それ自体がERBB3変異体の上昇を示したが、アンカレッジ非依存性増殖または下流シグナル伝達を促進しなかった。ERBB3変異体の腫瘍形成活性をさらに確認するために、いくつかの多発点ECD変異体発現細胞を、それらが生体内の腫瘍増殖を促進する能力を検査した。それらがアンカレッジ非依存性増殖およびシグナル伝達を支援する能力と一致して、ERBB3 V104M、P262H、またはG284Rを共発現するIMCE細胞は、WTとはkとなり、ERBB2と一緒に腫瘍増殖を促進する(図13B(e))。

30

【0235】

ERBB3変異体は、IL3非依存性細胞生存および形質転換を促進する。

ERBB3変異の腫瘍形成の関連をさらに確認するために、ERBB3変異体を、シグナル伝達、細胞生存、およびアンカレッジ非依存性増殖に対するそれらの影響について、それらを単独で、またはEGFRもしくはERBB2との組み合わせでのいずれかで、I

50

L - 3 依存性 BaF3 細胞中でそれらを安定した発現させることにより検査した。BaF3 は、遺伝子の腫瘍形成活性、および標的腫瘍形成ドライバーを標的とする薬物の開発を研究するために広く使用されているインターロイキン(IL) - 3 依存性 pro - B 細胞株である (Lee et al. (2006). PLoS medicine 3, e485, Warmuth et al. (2007) Current opinion in oncology 19, 55 - 60)。ERBB3 変異体は、単独で発現されたとき、BaF3 細胞の IL - 3 非依存性生存をほとんど、または全く促進しなかったが、EGFR - WT または ERBB2 - WT との組み合わせで共発現されたとき、WT - ERBB3 よりもはるかに有効であった (図 14 および図 15 A、B)。ERBB2 と共に発現された ERBB3 変異体は、約 10 ~ 50 倍以上、IL - 3 非依存性生存を促進することにおいて、EGFR と共に発現されたときよりはるかに有効であった (図 14)。これは、活性化後に形成される ERBB3 - ERBB2 ヘテロ二量体が、細胞シグナル伝達の最も有力な活性因子に含まれることを示す以前の研究と一致する (Pinkas-Kramarski et al. The EMBO journal 15, 2452 - 2467 (1996)、Tzaharet et al. Molecular and cellular biology 16, 5276 - 5287 (1996)、Holbroek et al. PNAS 100, 8933 - 8938 (2003))。興味深いことに、Q809R キナーゼドメイン変異体は、ERBB2 または EGFR との組み合わせで、BaF3 細胞の IL - 3 非依存性生存を促進することにおいて、検査した ECD 変異体のどれよりも有効であった。観測される IL - 3 非依存性細胞生存活性と一致して、ERBB3 変異体の大部分は、単独で、または ERBB2 または EGFR との組み合わせで発現されるとき、リン酸化の増加、活性 ERBB 受容体の署名を示した (図 15 A ~ C)。さらに、ERBB2 と共に発現した ERBB3 変異体は、ERBB3 - WT と比較して、p - ERBB2 (Y1221 / 2) の上昇を示した (図 15 C)。また EGFR または ERBB2 との組み合わせで、ERBB3 変異の大部分は、ERBB3 変異体による構成的下流シグナル伝達と一致して、p - AKT および p - ERK レベルの上昇を示した (図 15 B、C)。ERBB3 変異体が BaF3 細胞の IL 3 非依存性生存を促進する能力を確認し、次に、これらの変異体がアンカレッジ非依存性増殖を促進する能力を調べた。P262H、G284R、および Q809R ERBB3 変異体を、ERBB2 との組み合わせで安定的に発現する BaF3 細胞は、ERBB3 - WT と比較して、頑強なアンカレッジ非依存性増殖を促進したことが分かった (図 16)。変異体のいくつかは、EGFR を用いて発現されると、いくつかのアンカレッジ非依存性増殖を促進したが、この影響は、ERBB2 との組み合わせで観測されるほど顕著ではなかった。これは、ERBB2 媒介性腫瘍形成シグナル伝達における ERBB3 の要件を確立する、以前の報告と一致する (Holbroek et al. PNAS 100, 8933 - 8938 (2003)、Lee-Hoeftlich et al. Cancer Research 68, 5878 - 5887 (2008))。

【0236】

BaF3 システムを使用して、6 つの ECD 多発点変異体および 4 つの ERBB3 キナーゼドメイン変異体 (V714M、Q809R、S846I、および E928G) を含む、いくつかの ERBB3 ECD 変異体 (V104M、A232V、P262H、P262S、G284R、および T389K) を、IL - 3 非依存性細胞生存、シグナル伝達、およびアンカレッジ非依存性増殖に対するそれらの影響について、ERBB3 変異体を単独で、または ERBB2 との組み合わせで安定した発現することにより検査した。ERBB3 は、キナーゼ不全であり、リガンド結合に続いて、ERBB2 とのヘテロ二量体を選択的に形成して、シグナル伝達を促進する (Holbroek et al. (2003) 上記、Karunagaran et al. (1996) The EMBO journal 15, 254 - 264; Lee-Hoeftlich et al. (2008) 上記、Sliwkowski et al. (1994) 上記)。これと一致して、外因性リガンドの不在下で、ERBB3 野生型 (WT) および ERBB3 変異体は、それ自体が BaF3 細胞の IL - 3 非依存性生存を促進しなかった (図 37 A)。しかしながら、外

10

20

30

40

50

因性 E R B B 3 の不在下で、 E R B B 3 変異体は、 E R B B 3 - W T とは異なり、 E R B B 2 と共に発現されたとき、 I L 3 依存性 B a F 3 細胞生存を促進し(図 37 A)、 E R B B 3 変異体が、リガンド非依存的様式で機能し得ることを示す。 E R B B 3 変異体の細胞生存活性は、それらがキナーゼ死(K D) E R B B 2 K 7 5 3 M 変異体と共に発現したときに廃止され、キナーゼ活性 E R B B 2 の要件を確認する(図 37 A)。 E R B B 3 変異体を、それらがアンカレッジ非依存性増殖を促進する能力についてさらに調べた。 E R B B 3 変異体は、生存アッセイにおいて観測されるとおり、それ自体はアンカレッジ非依存性増殖を支援しなかった(図 37 B)。しかしながら、 E R B B 2 との組み合わせで検査される E R B B 3 変異体の大部分は、 E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する B a F 3 細胞と比較して、アンカレッジ非依存性増殖を促進した(図 37 B ~ C)。 E R B B 3 により促進されたアンカレッジ非依存性増殖は、 E R B B 3 変異体が E R B B 2 - K D との組み合わせでコロニー形成を促進しなかったため、 E R B B 2 のキナーゼ活性に依存することが確認された(図 37 B ~ B)。 B a F 3 細胞のウェスタンプロット分析は、 E R B B 3 変異体の発現が、 E R B B 2 との組み合わせで、 E R B B 3 - W T と比較して、 p E R B B 3 、 p E R B B 2 、 p A K T 、および / または p E R K の増加につながったことを示した(図 37 D ~ F)。細胞生存活性またはアンカレッジ非依存性増殖の欠失と一致して、 E R B B 3 変異体は、それ自体または E R B B 2 - K D との組み合わせで、 p E R B B 2 および / または p A K T / p E R K の上昇を示さなかつたが(図 37 D ~ F)、 E R B B 3 変異体は、それ自体が、 B a F 3 細胞により発現された内因性 E R B B 2 に起因する可能性がある p E R B B 3 レベルのいくらかの上昇を示した。 E R B B 2 との組み合わせで、その弱いシグナル伝達と一致する E R B B 3 V 7 1 4 M キナーゼドメイン変異体は、わずかな細胞生存活性を示し、アンカレッジ非依存性増殖を示さなかつた(図 37 A ~ C)。対照的に、最も活性な Q 8 0 9 R 変異体は、 E R B B 2 との組み合わせで、 E R B B 3 - W T と比較して、頑強な下流シグナル伝達を示した(図 37 A ~ C)。

【 0 2 3 7 】

E R B B 3 変異体によるリガンド非依存性腫瘍形成シグナル伝達

E R B B 3 変異体が腫瘍形成シグナル伝達を促進する機序を理解する目的で、 B a F 3 系を使用して E R B B 3 変異体のリガンド依存性を検査した。

【 0 2 3 8 】

E R B B 3 変異体によりリガンド非依存性シグナル伝達を確立するために、それらが I L - 3 非依存性 B a F 3 生存を、漸増用量の抗 N R G 1 抗体、 E R B B リガンド中和抗体下で促進する能力を検査した。 N R G 1 中和抗体の付加(Hegde et al. Manuscript submitted (2011))は、 E R B B 3 変異体が I L - 3 非依存性生存またはアンカレッジ非依存性コロニー形成を促進する能力に対して悪影響を及ぼさなかつた(図 17)。これと一致して、細胞表面受容体架橋に続いて行われる免疫沈降において、リガンドの不在下、 E R B B 3 - W T および E R B B 2 を架橋する B a F 3 細胞と比較して、 E R B B 3 変異体 / E R B B 2 へテロ二量体のレベルの増加についての証拠を発見した(図 18)。これは、 E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する細胞と比較したときに、近接結紮アッセイを使用して、 I L - 3 または N R G 1 の不在下で培養された E R B B 3 変異体 / E R B B 2 を発現する B a F 3 細胞中の細胞表面ヘテロ二量体のレベルの上昇によりさらに確認された(Soderberget al. Nat Methods 3, 995 - 1000 (2006))(図 19 および図 20 A ~ B)。これらのデータは、 E R B B 3 変異体が、 E R B B 2 との組み合わせで、 B a F 3 の I L - 3 生存を、 N R G 1 非依存的に促進できることを示唆する。

【 0 2 3 9 】

E R B B 3 変異体がリガンドに非依存的にシグナル伝達することができることが確立されたため、それらの活性がリガンド付加により補助され得るかどうかを検査した。 N R G 1 が、 E R B B 3 - W T または変異体を単独で発現する B a F 3 細胞の生存を支援できないことが分かった(図 20 C)。しかしながら、検査した最高濃度では、 E R B B 3 変異体の対部分を E R B B 2 と一緒に発現する B a F 3 細胞の I L - 3 非依存性生存は、 E R

10

20

30

40

50

B B 3 - W T / E R B B 2 発現細胞と同様の方法で増加した(図21)。興味深いことに、A 2 3 2 V E R B B 3 変異体は、W T E R B B 3 のように、N R G 1 用量依存性I L - 3 非依存性生存応答を示した(図21)。対照的に、G 2 8 4 R およびQ 8 0 9 R は、これらの変異体を発現する未治療細胞と比較したときに、リガンド付加に続いて生存の著しい増加を示さなかった。G 2 8 4 R E C D およびQ 8 0 9 R キナーゼドメイン変異体によるリガンド付加に対する最小応答は、これらの変異体によるシグナル伝達のリガンド非依存性モードの支配的役割を示唆する(図21)。これと一貫して、リガンド付加に続いて、P 2 6 2 H およびW T E R B B 3 は、ヘテロ二量体形成の増加を示したが、G 2 8 4 R E C D 変異体およびQ 8 0 9 R キナーゼドメイン変異体は、未刺激細胞と比較したときに、ヘテロ二量体形成のわずかな増加を示した(図18)。これらの結果は、全てのE R B B 3 変異体はリガンド非依存性シグナル伝達することができるが、それらのうちの一部は、依然としてリガンド刺激に応答することができることを示す。

10

【0240】

E R B B 3 変異体が腫瘍形成シグナル伝達を促進する機序をさらに理解するために、抗N R G 1 抗体を中和する漸増用量のE R B B 3 リガンドでこれらの細胞を処置することにより、B a F 3 系中のE R B B 3 変異体のリガンド依存性を検査した(H e g d e et al. (2011)上記)。N R G 1 中和抗体(I d)の付加は、E R B B 3 変異体がI L - 3 依存性生存を促進する能力に影響を及ぼさないことが分かった(図37G)。図37Hでは、E R B B 3 E C D 変異体は、漸増用量の外因性N R G 1 に応答して、I L - 3 非依存性B a F 3 生存を示す。

20

【0241】

E R B B 3 変異体は、生体内で腫瘍形成を促進する。

B a F 3 細胞が、腫瘍遺伝子の異所性発現によりI L - 3 非依存性にし、マウスに埋め込まれたときに白血病様疾患を促進し、全体的な生存の低下につながることを示した(H ornet al. Oncogene 27, 4096 - 4106 (2008)、Jai swalet al. Cancer Cell 16, 463 - 474 (2009))。E R B B 3 - W T を発現するB a F 3 細胞、E C D 変異体(P 2 6 2 H またはG 2 8 4 R)、またはキナーゼドメインE R B B 3 変異体(Q 8 0 9 R)が、E R B B 2 との組み合わせで、白血病様疾患を促進する能力について検査した。E R B B - W T 単独で形質導入されたB a F 3 細胞、またはE R B B 2 を空ベクターと一緒に对照として使用した。E R B B 3 変異体を発現するB a F 3 細胞を、E R B B 2と一緒に移植したマウスは、22 ~ 27日の平均生存を示したことが分かった(図22)。対照的に、E R B B 3 - W T 単独またはE R B B 2 を空ベクターと共に発現するB a F 3 細胞を受けるマウスは、60日間の研究期間の最後に全て生きていた。しかしながら、E R B B 3 - W T およびE R B B 2 を共発現するB a F 3 細胞を受ける動物は、著しく長い潜伏期間と共に白血病様疾患を発症した(39日、図22)。E R B B 3 - W T / E R B B 2 B a F 3 細胞は、生体外でI L - 3 非依存性を示さなかつたが、動物モデルにおけるそれらの活性は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 二量体を活性化することができる生体内環境における増殖因子およびサイトカインの存在に起因する可能性があり、E R B B 3 - E R B B 2 ヘテロ二量体について報告されたリガンド依存性シグナル伝達に部分的に起因する(J unttila et al. Cancer Cell 15, 429 - 440 (2009))。疾患の進行を追跡するために、処置につき3匹のマウスの追加集団に対して、20日目に剖検を行った。これらの動物からの骨髄、脾臓、および肝臓試料を病理的異常について検討した。B a F 3 細胞はe G F P でタグ付けされたため、単離した骨髄および脾臓を、蛍光活性化細胞分類(F A C S)により浸潤細胞について調べた。生存の減少と一致して、E R B B 3 変異体/E R B B 2 を発現する細胞を移植したマウスからの骨髄および脾臓は、E R B B 3 - W T またはE R B B 2 / 空ベクター対照細胞を受けたマウスからの骨髄および脾臓と比較して、著しい比率の浸潤するe G F P 陽性細胞を示した(図23 ~ 26)。さらに、観測された長い潜伏機関と一致して、非常に低いレベルの浸潤e G F P 陽性細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 - W T 細胞を受ける動物からの肝臓および脾臓において検出された

30

40

50

。また E R B B 3 変異体 / E R B B 2 アームからの動物は、20日目の空ベクター対照または E R B B 3 - W T / E R B B 2 と比較して、脾臓（図 25 A および図 27）および肝臓（図 25 B および図 27）のサイズおよび重量の増加を示し、さらに浸潤細胞の存在を確認する。加えて、ヘマトキシリンおよびエオシン（H & E）染色された骨髄、脾臓、および肝臓区分の組織学的評価は、20日目の対照と比較したときに、E R B B 3 変異体 / E R B B 2 を発現する細胞を有する動物における芽細胞の著しい浸潤を示した（図 26）。これらの結果は、E R B B 3 変異体の生体内腫瘍形成能力を実証する。

【0242】

標的治療は、E R B B 3 変異体に対して有効である。

E R B B 受容体を直接標的とする複数の薬剤は、様々な癌を治療するために承認される（Baselga and Swain Nature Reviews Cancer 9, 463 - 475 (2009)、Alvarez et al. Journal of Clinical Oncology 28, 3366 - 3379 (2010)）。E R B B 3 を含むE R B B ファミリーメンバー、およびそれらの下流成分を標的とするいくつかの追加の候補薬は、臨床試験および開発の様々な段階にある（Alvarez et al. Journal of Clinical Oncology 28, 3366 - 3379 (2010)）。トラスツズマブ - E R B B 2 ドメイン I V に結合する抗 E R B B 2 抗体（Junttila et al. Cancer Cell 15, 429 - 440 (2009)）、ペルツズマブ - E R B B 2 ドメイン I I に結合し、二量体化を防ぐ抗 E R B B 2 抗体（Junttila et al. Cancer Cell 15, 429 - 440 (2009)）、抗 E R B B 3 1 - リガンド結合を遮断する（ドメイン I I I に結合する）抗 E R B B 3 (Schaefer, G. et al. Cancer Cell (2011)）、抗 E R B B 3 2 - ドメイン I I I に結合し、リガンド結合を遮断する抗 E R B B 3 抗体（Wilson et al. Cancer Cell 20, 158 - 172 (2011)）、MEHD7945A - リガンド結合を遮断する（EGFR および E R B B 3 のドメイン I I I に結合する）二重 E R B B 3 / EGFR 抗体（Schaefer, G. et al. Cancer Cell (2011)）、セツキシマブ - リガンド結合を遮断する（EGFR のドメイン I I I に結合する）EGFR 抗体（Li, S. et al. Cancer Cell 7, 301 - 311 (2005)）、ラバチニブ（Medina, P. J. & Goodin, S. Clin Ther 30, 1426 - 1447 (2008)） - 二重 E R B B 2 / EGFR 低分子阻害剤および G D C - 0941 (Edgar, K. A. et al. Cancer Research 70, 1164 - 1172 (2010)) - PI3K 阻害剤を、B a F 3 系を使用して、細胞増殖およびコロニー形成を遮断することに対するそれらの影響について検査した（図 28、図 29、および図 30）。抗体のサブセットを、生体内の有効性についても検査した（図 31）。増殖およびコロニー形成アッセイの両方において、Q 809 R に対する場合を除いて、試験される全ての変異体に対して非常に有効である低分子阻害剤ラバチニブ、および全ての変異体に対して有効である G D C - 0941 は、検査される用量で部分的に有効であるに過ぎないことが分かった（図 28 および 29）。コロニー形成アッセイにおいて検査される抗体の中で、トラスツズマブ抗 E R B B 3 . 2 および MEHD7945 は、検査される全ての変異体に対して全て有効であった（図 28 および 29）。しかしながら、ペルツズマブ、抗 E R B B 3 . 1 および G D C - 0941 は、E R B B 3 E C D 変異体により誘導される増殖およびコロニー形成を遮断することにおいて非常に有効であるが、Q 809 R キナーゼドメイン E R B B 3 変異体に対して中度に有効であるに過ぎなかった（図 28 および 29）。これと一致して、変異体 E R B B 3 および E R B B 2 を共発現する B a F 3 細胞中、生体外で効果的であるとき、これらの薬剤は、p A K T および / または p E R K レベル、および E R B B 3 および / または p E R B B 3 のレベルも遮断または低減した（図 32 および図 33）。

【0243】

トラスツズマブ、抗 E R B B 3 . 1 および抗 E R B B 3 . 2 も、G 284 R および Q 8

10

20

30

40

50

0 9 R E R B B 3 変異体に対して、B a F 3 系を生体内で使用して検査した（図 3 1、3 4、および 3 5）。生体外で観測されるように、トラスツズマブは、G 2 8 4 R または Q 8 0 9 R E R B B 3 / E R B B 2 を発現する B a F 3 を受けるマウスにおける白血病様疾患を遮断することにおいて非常に有効であった（図 3 1 A）。同様に、抗 E R B B 3 . 1 および抗 E R B B 3 . 2 は、G 2 8 4 R E R B B 3 - E C D および E R B B 2 を共発現する B a F 3 を受けるマウスにおける白血病様疾患の発症を遮断した（図 3 1 A）。しかしながら、これらの抗 E R B B 3 抗体は、未治療の対照動物と比較して、生存を著しく改善したが、Q 8 0 9 R E R B B 3 / E R B B 2 を発現する B a F 3 細胞を受けるマウスにおける疾患の発症を遮断することにおいて部分的に有効であるに過ぎなかった（図 3 1 B）。標的治療について観測された有効性と一致して、脾臓および骨髄において E R B B 3 変異体を発現する浸潤 B a F 3 細胞の著しい減少を発見した（図 3 4 および図 3 6）。観測される B a F 3 細胞の浸潤の低下と一致して、脾臓および肝臓重量は、B a 1 b / C ヌードマウスについて予想される正常範囲内であった（図 3 5 および図 2 5）。これらのデータは、開発中であるか、またはヒト使用のために承認された複数の治療薬が、E R B B 3 変異体駆動型腫瘍に対して有効であり得ることを示す。

10

【 0 2 4 4 】

この研究では、結腸癌および胃癌における頻繁な E R B B 3 体細胞変異の特定を報告する。特定した変異のいくつかは、腫瘍形成変異の特徴である多発点を形成する複数の非依存性試料において発生する。

20

【 0 2 4 5 】

これらの生体外および生体内機能研究は、E C D およびキナーゼドメイン E R B B 3 変異体の両方の腫瘍形成性質を実証する。さらに、リガンド滴定実験を使用して、E C D 変異体の一部、V 1 0 4 M、P 2 6 2 H、Q 2 8 4 R、およびT 3 8 9 K が、E R B B 3 リガンド N R G 1 の不在下で腫瘍形成性であるが、N R G 1 の付加によりさらに刺激され得ることを示す。E C D 変異は、W T に対して非繫留確認に対して繫留された E R B B E C D と非繫留 E R B B 3 E C D との間の均衡を移行させ得る。

20

【 0 2 4 6 】

いくつかの治療薬を、E R B B 3 変異体駆動型腫瘍形成シグナル伝達を標的とすることにおける生体外および生体内の両方でのそれらの利用性について検査したところ、複数の低分子阻害剤、抗 E R B B 2 および抗 E R B B 3 E C D 抗体は、検査した E R B B 3 変異体の大部分により腫瘍形成シグナル伝達を遮断することにおいて非常に有効であることが分かった。興味深いことに、ペルツズマブ、抗 E R B B 3 . 1 および G D C - 0 9 4 1 は、キナーゼドメイン変異体 Q 8 0 9 R を遮断することにおいて有効ではなく、この変異による顕著な作用機序を示す。以前の研究は、ペルツズマブがリガンド媒介性 E R B B 3 / E R B B 2 二量体化を遮断することにおいて非常に有効であるが、トラスツズマブは、リガンド非依存性 E R B B 2 / E R B B 3 二量体形成を遮断することにおいてより有効であることを示した（Junttila, T. T. et al. Cancer Cell 15, 429 - 440 (2009)）。これと一致して、リガンド非応答性キナーゼドメイン E R B B 3 変異体 Q 8 0 9 R は、ペルツズマブと比較して、トラスツズマブによる阻害に対してはるかに応答性が高く、Q 8 0 9 R E R B B 3 シグナル伝達における非リガンドヘテロ二量体錯体に対する潜在的な役割を示唆する。P I 3 K 阻害剤 G D C - 0 9 4 1 は、検査した E R B B 3 変異体の大部分に対して非常に活性であるが、キナーゼドメイン変異体 Q 8 0 9 R を遮断することにおけるその低い有用性は、P I 3 キナーゼに加えて、他の下流シグナル伝達分子の関与を示唆する。

30

【 0 2 4 7 】

s h R N A 媒介性 E R B B 3 ノックダウンは、生体内増殖に影響を及ぼす。

I M C E 細胞における E R B B 3 変異体の腫瘍形成活性を確立した後、腫瘍細胞株におけるノックダウン E R B B 3 の影響を検査しようとした。近年の研究は、C W - 2、結腸細胞株、および D V 9 0 、肺株が、それぞれ E R B B 3 E 9 2 8 G および V 1 0 4 M 変異体を発現することを報告した。以前に公表された標的構成を使用して E R B B 3 を標的

40

50

とするドキシサイクリン (d o x) 誘導性 s h R N A を発現する、安定した C W - 2 および D V 9 0 細胞株を生成した (G a r n e t t et al. (2 0 1 2) N a t u r e 4 8 3 , 5 7 0 - 5 7 5)。配列決定を標的とする d o x 誘導性ルシフェラーゼ (l u c) を発現した対照株も生成した。d o x 誘導時に、l u c s h R N A 発現株とは対照的に、E R B B 3 および p E R K のレベルは、E R B B 3 s h R N A を発現した細胞において減少した (図 3 8 A ~ B)。d o x 誘導後の E R B B 3 の喪失と一致して、D V 9 0 および C W - 2 はいずれも、ルシフェラーゼ s h R N A 株または非誘導株と比較して、アンカレッジ非依存性増殖の低下を示した (図 3 8 C ~ F)。次に、D V 9 0 および C W - 2 細胞中の E R B B 3 のノックダウンが、腫瘍を生体内で形成する能力に影響を及ぼし得るかどうかを検査した。s h R N A を標的とする E R B B 3 の d o x 媒介性誘導時に、D V 9 0 および C W - 2 細胞はいずれも、l u c - s h R N A を発現したか、または E R B B 3 s h R N A を発現するように誘導されない D V 9 0 または C W - 2 細胞を担持する動物と比較して、腫瘍増殖の著しい減少を示した (図 3 8 G ~ J)。これらのデータと一緒に考慮して、腫瘍発生における E R B B 3 変異の役割をさらに確認する。

【図 1 A】

試料				
試料 ID	Src 名	マッチした 参考試料 ID	疾患カテゴリ	組織サブカテ ゴリー
96336	HF-1237	87323	直腸の腫瘍	腺癌
94992	HF-17829(4)	94591	直腸の腫瘍	腺癌
95594	HF-18430(4)	95506	直腸の腫瘍	腺癌
95735	HF-18060(4)	95739	直腸の腫瘍	腺癌
96115	HF-18138(4)	96119	直腸の腫瘍	腺癌
96157	HF-18152(4)	96161	直腸の腫瘍	腺癌
96391	HF-18172(4)	96395	直腸の腫瘍	腺癌
96445	HF-18190(4)	96449	直腸の腫瘍	腺癌
96562	HF-18254(4)	96566	直腸の腫瘍	腺癌
96737	HF-18500(4)	96741	直腸の腫瘍	腺癌
101763	HF-17944(4)	101761	直腸の腫瘍	腺癌
94290	HF-17545(4)	94199	直腸	腺癌
101592	HF-30325(1)	101590	直腸	腺癌
86582	HF-15220(4)	86927	直腸の遠隔転移	腺癌
100695	HF-19917(3)	100693	直腸の遠隔転移	腺癌
86337	HF-1480	87322	直腸の遠隔転移	腺癌
86337	HF-1480	87322	直腸の遠隔転移	腺癌
86337	HF-1480	87322	直腸の遠隔転移	腺癌
86341	HF-2468	87326	直腸の遠隔転移	腺癌
86342	HF-3525	87327	直腸の遠隔転移	腺癌
86343	HF-1446	87328	直腸の遠隔転移	腺癌
86345	HF-1602	87320	直腸の遠隔転移	腺癌
95147	HF-17899(4)	95144	直腸の遠隔転移	腺癌
95165	HF-17920(4)	95164	直腸の遠隔転移	腺癌
95256	HF-18263(4)	95354	直腸の遠隔転移	腺癌
95362	HF-18277(4)	95360	直腸の遠隔転移	腺癌
95374	HF-18295(4)	95372	直腸の遠隔転移	腺癌
95498	HF-18248(4)	95502	直腸の遠隔転移	腺癌
95669	HF-18264(4)	95673	直腸の遠隔転移	腺癌
95681	HF-18030(4)	95685	直腸の遠隔転移	腺癌
95687	HF-18032(4)	95691	直腸の遠隔転移	腺癌
95699	HF-18036(4)	95703	直腸の遠隔転移	腺癌
95729	HF-17998(4)	95733	直腸の遠隔転移	腺癌
95556	HF-18092(4)	95960	直腸の腫瘍	腺癌
96121	HF-18140(4)	96125	直腸の腫瘍	腺癌
96139	HF-18164(4)	96143	直腸の腫瘍	腺癌
96145	HF-18148(4)	96149	直腸の腫瘍	腺癌
96205	HF-18154(4)	96209	直腸の腫瘍	腺癌
96496	HF-18198(4)	96300	直腸の腫瘍	腺癌
96630	HF-18420(4)	96634	直腸の腫瘍	腺癌
96654	HF-18478(4)	96658	直腸の腫瘍	腺癌
96669	HF-18418(4)	96693	直腸の腫瘍	腺癌

【図 1 B】

95689	HF-18418(1)	95693	直腸直腸癌	腺癌
96119	HF-18494(1)	95723	直腸直腸癌	腺癌
95725	HF-18496(1)	95729	直腸直腸癌	腺癌
95767	HF-18512(1)	96771	直腸直腸癌	腺癌
96876	HF-18504(1)	96688	直腸直腸癌	腺癌
96951	HF-18572(1)	96955	直腸直腸癌	腺癌
97041	HF-18596(1)	97045	直腸直腸癌	腺癌
97059	HF-18602(1)	97063	直腸直腸癌	腺癌
97073	HF-18604(1)	97079	直腸直腸癌	腺癌
97101	HF-18612(1)	97105	直腸直腸癌	腺癌
97458	HF-18301(1)	97456	直腸直腸癌	腺癌
97509	HF-17958(1)	97507	直腸直腸癌	腺癌
97672	HF-18519(1)	97676	直腸直腸癌	腺癌
97938	HF-18315(1)	97935	直腸直腸癌	腺癌
97944	HF-18359(1)	97942	直腸直腸癌	腺癌
97959	HF-18361(1)	97949	直腸直腸癌	腺癌
98491	HF-18284(1)	98489	直腸直腸癌	腺癌
101775	HF-18267(1)	101773	直腸直腸癌	腺癌
101787	HF-18281(1)	101785	直腸直腸癌	腺癌
101886	HF-20391(1)	101884	直腸直腸癌	腺癌
86339	HF-2400	97324	直腸直腸癌	腺癌
86340	HF-2400	87325	直腸直腸癌	腺癌
95149	HF-17903(1)	95148	直腸直腸癌	腺癌
95221	HF-17942(1)	95219	直腸直腸癌	腺癌
95462	HF-18339(1)	95460	直腸直腸癌	腺癌
95593	HF-18096(1)	95599	直腸直腸癌	腺癌
95705	HF-18578(1)	95709	直腸直腸癌	腺癌
95717	HF-17944(1)	95721	直腸直腸癌	腺癌
95753	HF-18046(1)	95757	直腸直腸癌	腺癌
95897	HF-18074(1)	95891	直腸直腸癌	腺癌
95909	HF-18078(1)	95913	直腸直腸癌	腺癌
95658	HF-18118(1)	96060	直腸直腸癌	腺癌
96241	HF-18170(1)	96245	直腸直腸癌	腺癌
95669	HF-18178(1)	96413	直腸直腸癌	腺癌
95602	HF-18534(1)	96508	直腸直腸癌	腺癌
95514	HF-18438(1)	96518	直腸直腸癌	腺癌
95618	HF-18466(1)	96622	直腸直腸癌	腺癌
95624	HF-18468(1)	96628	直腸直腸癌	腺癌
95672	HF-18484(1)	96676	直腸直腸癌	腺癌
95791	HF-18520(1)	96795	直腸直腸癌	腺癌
95810	HF-18528(1)	96814	直腸直腸癌	腺癌
95828	HF-18543(1)	96832	直腸直腸癌	腺癌
95894	HF-18556(1)	96898	直腸直腸癌	腺癌
96918	HF-18564(1)	96922	直腸直腸癌	腺癌
96945	HF-18570(1)	96949	直腸直腸癌	腺癌
96963	HF-18576(1)	96967	直腸直腸癌	腺癌
96969	HF-18578(1)	96973	直腸直腸癌	腺癌
97005	HF-18594(1)	97009	直腸直腸癌	腺癌

【図1C】

97047	HF-18596-(1)	97051	吉野の四季	和歌	1214
97053	HF-18600-(1)	97057	吉野の四季	和歌	1214
97056	HF-17994-(1)	97054	吉野の四季	和歌	1214
97057	HF-18285-(1)	97050	吉野の四季	和歌	1214
97058	HF-18786-(1)	97056	吉野の四季	和歌	1214
98083	HF-18253-(1)	98079	吉野の四季	和歌	1214
98107	HF-18323-(1)	98103	吉野の四季	和歌	1214
98123	HF-18327-(1)	98119	吉野の四季	和歌	1214
98673	HF-18818-(1)	98471	吉野の四季	和歌	1214
101904	HF-20397-(1)	101902	吉野の四季	和歌	1214
101910	HF-20394-(1)	101908	吉野の四季	和歌	1214
101922	HF-20403-(1)	101920	吉野の四季	和歌	1214
101988	HF-20355-(1)	101986	吉野の四季	和歌	1214
103183	HF-20411-(1)	103181	吉野の四季	和歌	1214
88024	HF-7082-(1)	88023	食の歌	和歌	1214
88026	HF-7080-(1)	88025	食の歌	和歌	1214
88028	HF-8020-(1)	88027	食の歌	和歌	1214
88173	HF-92294-(1)	88172	食の歌	和歌	1214
88175	HF-16285-(1)	88174	食の歌	和歌	1214
94018	HF-64674-(1)	94017	食の歌	和歌	1214
94020	HF-6966-(1)	94019	食の歌	和歌	1214
94021	HF-7046-(1)	94022	食の歌	和歌	1214
94024	HF-7061-(1)	94023	食の歌	和歌	1214
94023	HF-17252-(1)	94026	食の歌	和歌	1214
94646	HF-18357-(1)	94644	食の歌	和歌	1214
96093	HF-19089-(1)	96091	食の歌	和歌	1214
100663	HF-19394-(1)	100667	食の歌	和歌	1214
101410	HF-20091-(1)	101418	食の歌	和歌	1214
101414	HF-20333-(1)	101412	食の歌	和歌	1214
92160	HF-171524-(1)	92158	音韻	和歌	1214
94203	HF-17564-(1)	94191	音韻	和歌	1214
94283	HF-172684-(1)	94386	音韻	和歌	1214
96240	HF-17594-(1)	96197	音韻	和歌	1214
96242	HF-176994-(1)	96431	音韻	和歌	1214
96472	HF-173564-(1)	94471	音韻	和歌	1214
96533	HF-18840-(1)	96431	音韻	和歌	1214
98439	HF-18842-(1)	98437	音韻	和歌	1214
98982	HF-19113-(1)	98980	音韻	和歌	1214
101576	HF-203194-(1)	101572	音韻	和歌	1214
101598	HF-20327-(1)	101596	音韻	和歌	1214
92175	HF-171745-(1)	92184	音韻	和歌	1214
92192	HF-172404-(1)	92193	音韻	和歌	1214
94218	HF-17554-(1)	94196	音韻	和歌	1214
94227	HF-17554-(1)	94199	音韻	和歌	1214
94263	HF-171594-(1)	94266	音韻	和歌	1214
94303	HF-171884-(1)	94306	音韻	和歌	1214
94307	HF-171894-(1)	94310	音韻	和歌	1214
94315	HF-171974-(1)	94318	音韻	和歌	1214

【図1D】

97696	HF-18844-(1)	97694	音韻	和歌	1214
97708	HF-188484-(1)	97706	音韻	和歌	1214
97714	HF-18850-(1)	97712	音韻	和歌	1214
98204	HF-17945-(1)	98203	音韻	和歌	1214
98248	HF-18177-(1)	98246	音韻	和歌	1214
98409	HF-18832-(1)	98407	音韻	和歌	1214
98427	HF-18838-(1)	98425	音韻	和歌	1214
98664	HF-19107-(1)	98662	音韻	和歌	1214
99035	HF-19154-(1)	99039	音韻	和歌	1214
100063	HF-20021-(1)	100061	音韻	和歌	1214
100543	HF-19412-(1)	100547	音韻	和歌	1214
100549	HF-19437-(1)	100553	音韻	和歌	1214
91925	HF-17225-(1)	91923	音韻	和歌	1214
88167	HF-16843	88168	音韻	和歌	1214
88170	HF-16820	88169	音韻	和歌	1214
88942	HF-17078-(1)	88910	音韻	和歌	1214
91913	HF-17079-(1)	91910	音韻	和歌	1214
91919	HF-17224-(1)	91922	音韻	和歌	1214
91931	HF-17229-(1)	91934	音韻	和歌	1214
91937	HF-17268-(1)	91940	音韻	和歌	1214
98747	HF-17495-(1)	98746	音韻	和歌	1214
98751	HF-17499-(1)	98750	音韻	和歌	1214
98755	HF-17592-(1)	98754	音韻	和歌	1214
88795	HF-15545-(1)	88794	音韻	和歌	1214
88122	HF-16884	88121	音韻	和歌	1214
88124	HF-16888	88123	音韻	和歌	1214
88126	HF-16900	88125	音韻	和歌	1214
88128	HF-16892	88127	音韻	和歌	1214
91780	HF-16922-(1)	91779	音韻	和歌	1214
91816	HF-17668-(1)	91815	音韻	和歌	1214
91818	HF-17667-(1)	91817	音韻	和歌	1214
91820	HF-17688-(1)	91819	音韻	和歌	1214
91822	HF-17689-(1)	91844	音韻	和歌	1214
91824	HF-17690-(1)	91823	音韻	和歌	1214
95283	HF-18230-(1)	95286	音韻	和歌	1214
95288	HF-18233-(1)	95291	音韻	和歌	1214
97775	HF-18866-(1)	97779	音韻	和歌	1214
97781	HF-18689-(1)	97785	音韻	和歌	1214
97805	HF-18719-(1)	97809	音韻	和歌	1214
97856	HF-18757-(1)	97848	音韻	和歌	1214
97864	HF-18759-(1)	97852	音韻	和歌	1214
97868	HF-18790-(1)	97854	音韻	和歌	1214
97874	HF-18854-(1)	97884	音韻	和歌	1214
97896	HF-188864-(1)	97900	音韻	和歌	1214
99878	HF-19011-(1)	99882	音韻	和歌	1214
101594	HF-20371-(1)	101502	音韻	和歌	1214
101516	HF-20341-(1)	101514	音韻	和歌	1214

【図1E】

88130	HF-16894	88129	91710	和歌	1214
88131	HF-16873	88132	91710	和歌	1214
91812	HF-17648-(1)	91811	91710	和歌	1214
91816	HF-17691-(1)	91825	91710	和歌	1214
95305	HF-18385-(1)	95057	91710	和歌	1214
97293	HF-18713-(1)	97297	91710	和歌	1214
97344	HF-18782-(1)	97342	91710	和歌	1214
97360	HF-18786-(1)	97350	91710	和歌	1214
99125	HF-19099-(1)	99123	91710	和歌	1214
99952	HF-18692-(1)	99853	91710	和歌	1214
99971	HF-19098-(1)	99875	91710	和歌	1214
101486	HF-20033-(1)	101484	91710	和歌	1214
101498	HF-20335-(1)	101496	91710	和歌	1214
86315	HF-11765	87234	91710	和歌	1214
86316	HF-11765	87232	91710	和歌	1214
86327	HF-11754	87229	91710	和歌	1214
86501	HF-11731	87223	91710	和歌	1214
86503	HF-11734	87223	91710	和歌	1214
86506	HF-11743	87226	91710	和歌	1214
86507	HF-11744	87694	91710	和歌	1214
86527	HF-11744	87694	91710	和歌	1214
86557	HF-11744	87694	91710	和歌	1214
86557	HF-11744	87694	91710	和歌	1214
86564	HF-48104-(1)	86658	91710	和歌	1214
86570	HF-3711-(1)	86855	91710	和歌	1214
86578	HF-8025	87238	91710	和歌	1214
86583	HF-15224-(1)	86928	91710	和歌	1214
86748	HF-15355-(1)	87236	91710	和歌	1214
86751	HF-17175-(2)	86955	91710	和歌	1214
86770	HF-15217	86925	91710	和歌	1214
86775	HF-15555-(1)	87405	91710	和歌	1214
86783	HF-15553-(1)	87415	91710	和歌	1214
86786	HF-15539-(1)	87418	91710	和歌	1214
86789	HF-15567-(1)	87428	91710	和歌	1214
86790	HF-15570-(1)	87429	91710	和歌	1214
86792	HF-15565-(1)	87430	91710	和歌	1214
86796	HF-15566-(1)	87421	91710	和歌	1214
86796	HF-15546-(1)	87421	91710	和歌	1214
86796	HF-15564-(1)	87421	91710	和歌	1214
86798	HF-15549-(1)	87423	91710	和歌	1214

【図1F】

86316	HF-11795	87230	91710	和歌	1214
86319	HF-11766	87696	91710	和歌	1214
86320	HF-11770	86842	91710	和歌	1214
86321	HF-11772	86842	91710	和歌	1214
86322	HF-11776	85848	91710	和歌	1214
86324	HF-11782	85848	91710	和歌	1214
86325	HF-11751	87227	91710	和歌	1214
86326	HF-11752	87228	91710	和歌	1214
86328	HF-11756	87221	91710	和歌	1214
86329	HF-11763	87223	91710	和歌	1214
86330	HF-11767	87225	91710	和歌	1214
86331	HF-11771	86843	91710	和歌	1214
86332	HF-11780	86847	91710	和歌	1214
86333	HF-11783	86849	91710	和歌	1214
86334	HF-11785	86850	91710	和歌	1214
86502	HF-11732	87222	91710	和歌	1214
86503	HF-11737	86842	91710	和歌	1214
86567	HF-15212-(1)	86922	91710	和歌	1214
86568	HF-15212-(1)	86922	91710	和歌	1214
86569	HF-15212-(1)	86922	91710	和歌	1214
86571	HF-15218-(1)	86856	91710	和歌	1214
86572	HF-15274-(1)	86857	91710	和歌	1214

【図1G】

86591	HF-15240-(1)	86935	中小型船舶	中小型船舶
86752	HF-11769-(2)	87697	中小型船舶	船舶
86753	HF-11775-(2)	86845	中小型船舶	船舶
86769	HF-15213	86933	中小型船舶	船舶
86771	HF-15228	86930	中小型船舶	中小型船舶
86772	HF-15506-(2)	87402	中小型船舶	船舶
86773	HF-15511-(2)	87403	中小型船舶	中小型船舶
86774	HF-15512-(2)	87404	中小型船舶	船舶
86776	HF-15516-(1)	87406	中小型船舶	中小型船舶
86782	HF-15527-(2)	87414	中小型船舶	中小型船舶
86784	HF-15534-(1)	87416	中小型船舶	中小型船舶
86785	HF-15535-(1)	87417	中小型船舶	中小型船舶
86791	HF-15541-(1)	87419	中小型船舶	船舶
86794	HF-15523-(1)	87411	中小型船舶	中小型船舶
86797	HF-15547-(1)	87422	中小型船舶	船舶
86799	HF-15558-(1)	87424	中小型船舶	船舶
86800	HF-15559-(1)	87425	中小型船舶	中小型船舶
86801	HF-15560-(1)	87426	中小型船舶	中小型船舶
86802	HF-15561-(1)	87427	中小型船舶	中小型船舶
86803	HF-15563-(1)	87705	中小型船舶	中小型船舶
86835	HF-15576-(1)	97838	中小型船舶	中小型船舶
86839	HF-15594-(1)	87699	中小型船舶	船舶
86778	HF-15521-(1)	87409	中小型船舶	船舶
86779	HF-15522-(1)	87410	中小型船舶	中小型船舶
94671	HF-15894-(1)	106531	中小型船舶	中小型船舶
94699	HF-15901-(1)	106533	中小型船舶	船舶
94785	HF-15928-(1)	106537	中小型船舶	船舶
98819	HF-15878-(1)	106529	中小型船舶	船舶
98860	HF-18682-(1)	98864	中小型船舶	船舶
98866	HF-18683-(1)	98900	中小型船舶	船舶
100615	HF-19424-(1)	100619	中小型船舶	中小型船舶
100627	HF-19441-(1)	100631	中小型船舶	船舶
100641	HF-19967-(1)	100639	中小型船舶	船舶
101043	HF-20009-(1)	101041	中小型船舶	中小型船舶

【図1H】

101213	HF-20138-(1)	101217	中小型船舶	中小型船舶
101286	HF-20132-(1)	101290	中小型船舶	船舶
101359	HF-20166-(1)	101363	中小型船舶	船舶
101384	HF-20174-(1)	101388	中小型船舶	船舶
101668	HF-20305-(1)	101666	中小型船舶	中小型船舶
103691	HF-20502-(1)	103605	中小型船舶	中小型船舶
86533	HF-11779	105697	中小型船舶	船舶
86575	HF-2130	86851	中小型船舶	船舶
86583	HF-15230-(1)	86931	中小型船舶	中小型船舶
86588	HF-15234-(1)	87698	中小型船舶	船舶
86749	HF-15556-(1)	87237	中小型船舶	中小型船舶
86777	HF-15520-(1)	87406	中小型船舶	中小型船舶
86780	HF-15525-(1)	87412	中小型船舶	中小型船舶
86781	HF-15526-(1)	87413	中小型船舶	中小型船舶
86787	HF-15540-(1)	87703	中小型船舶	中小型船舶
86788	HF-15542-(1)	87420	中小型船舶	船舶
86793	HF-15519-(1)	87407	中小型船舶	中小型船舶
87967	HF-15503-(1)	87968	中小型船舶	中小型船舶
87969	HF-15487-(1)	87970	中小型船舶	中小型船舶
87971	HF-15479-(1)	87972	中小型船舶	中小型船舶
88177	HF-14976-(1)	88176	中小型船舶	船舶
89960	HF-15476-(1)	89928	中小型船舶	船舶
94675	HF-15895-(1)	106532	中小型船舶	船舶
94759	HF-15854-(1)	106541	中小型船舶	船舶
98804	HF-15924-(1)	106535	中小型船舶	中小型船舶
98807	HF-15913-(1)	106536	中小型船舶	中小型船舶
98810	HF-15850-(1)	106528	中小型船舶	中小型船舶
98861	HF-18664-(1)	98865	中小型船舶	船舶
98850	HF-18407-(1)	98848	中小型船舶	中小型船舶
98884	HF-18628-(1)	98883	中小型船舶	船舶
99217	HF-18639-(1)	99273	中小型船舶	船舶
99283	HF-18643-(1)	99281	中小型船舶	船舶
99319	HF-18655-(1)	99311	中小型船舶	中小型船舶
100635	HF-19913-(1)	100633	中小型船舶	船舶

【図1I】

100683	HF-19931-(1)	100681	中小型船舶	中小型船舶
100701	HF-19919-(1)	100699	中小型船舶	船舶
100739	HF-19931-(1)	100737	中小型船舶	中小型船舶
100753	HF-149935-(1)	100749	中小型船舶	中小型船舶
100783	HF-149945-(1)	100781	中小型船舶	中小型船舶
100789	HF-149947-(1)	100787	中小型船舶	中小型船舶
100831	HF-149953-(1)	100829	中小型船舶	船舶
100832	HF-149954-(1)	100835	中小型船舶	船舶
100849	HF-149959-(1)	100847	中小型船舶	中小型船舶
100867	HF-149964-(1)	100865	中小型船舶	中小型船舶
100879	HF-149973-(1)	100877	中小型船舶	船舶
100918	HF-149977-(1)	100916	中小型船舶	中小型船舶
100960	HF-149991-(1)	100958	中小型船舶	船舶
101001	HF-149995-(1)	101005	中小型船舶	船舶
101037	HF-20007-(1)	101035	中小型船舶	中小型船舶
101119	HF-149970-(1)	101117	中小型船舶	船舶
101125	HF-20005-(1)	101123	中小型船舶	船舶
101188	HF-20130-(1)	101192	中小型船舶	中小型船舶
101201	HF-20134-(1)	101205	中小型船舶	中小型船舶
101225	HF-20142-(1)	101229	中小型船舶	船舶
101317	HF-20152-(1)	101321	中小型船舶	船舶
101335	HF-20158-(1)	101339	中小型船舶	中小型船舶
101704	HF-20317-(1)	101702	中小型船舶	船舶
101714	HF-20348-(1)	101718	中小型船舶	船舶
102004	HF-16447-(1)	102008	中小型船舶	中小型船舶
102044	HF-20520-(1)	103048	中小型船舶	中小型船舶
102082	HF-20516-(1)	103061	中小型船舶	船舶
103591	HF-20701-(1)	103590	中小型船舶	船舶
103599	HF-20705-(1)	103598	中小型船舶	中小型船舶
103603	HF-20707-(1)	103602	中小型船舶	中小型船舶
103645	HF-20697-(1)	103643	中小型船舶	船舶
103651	HF-20699-(1)	103649	中小型船舶	中小型船舶
90963	HF-17050-(1)	90566	中小型船舶	中小型船舶
93119	HF-16159-(1)	92118	中小型船舶	中小型船舶
92124	HF-16277-(1)	92122	中小型船舶	船舶

【図1J】

98164	HF-18393-(1)	98162	中小型船舶	船舶
98598	HF-18770-(1)	98596	中小型船舶	中小型船舶
88013	HF-16897-(1)	88014	中小型船舶	中小型船舶
88015	HF-16899-(1)	88019	中小型船舶	中小型船舶
88016	HF-16901-(1)	88020	中小型船舶	中小型船舶
88017	HF-16902-(1)	88021	中小型船舶	中小型船舶
88018	HF-16903-(1)	88022	中小型船舶	中小型船舶
90528	HF-17525-(1)	90527	中小型船舶	中小型船舶
90540	HF-17528-(1)	90539	中小型船舶	中小型船舶
90552	HF-17531-(1)	90551	中小型船舶	中小型船舶
90574	HF-17532-(1)	90571	中小型船舶	中小型船舶
92121	HF-16154-(1)	92120	中小型船舶	中小型船舶
92125	HF-16260-(1)	92123	中小型船舶	中小型船舶
92439	HF-17796-(1)	92440	中小型船舶	中小型船舶
92441	HF-17785-(1)	92442	中小型船舶	中小型船舶
92445	HF-17786-(1)	92444	中小型船舶	中小型船舶
92447	HF-17788-(1)	92448	中小型船舶	中小型船舶
98110	HF-18395-(1)	98168	中小型船舶	中小型船舶
98188	HF-18401-(1)	98185	中小型船舶	中小型船舶
98200	HF-18405-(1)	98198	中小型船舶	中小型船舶
98561	HF-17782-(1)	98564	中小型船舶	中小型船舶
98586	HF-18389-(1)	98584	中小型船舶	中小型船舶
96160	HF-18774-(1)	96608	中小型船舶	中小型船舶
99024	HF-19072-(1)	99022	中小型船舶	中小型船舶
99045	HF-19081-(1)	99042	中小型船舶	中小型船舶
99054	HF-19082-(1)	99052	中小型船舶	中小型船舶
100399	HF-19130-(1)	100803	中小型船舶	中小型船舶
100811	HF-19132-(1)	100815	中小型船舶	中小型船舶
100817	HF-19133-(1)	100821	中小型船舶	中小型船舶
88181	HF-16365-(1)	92279	中小型船舶	中小型船舶
87862	HF-30874-(1)	87861	中小型船舶	中小型船舶
100434	HF-19453-(1)	100438	中小型船舶	中小型船舶
100494	HF-20041-(1)	100492	中小型船舶	中小型船舶
86367	HF-21794-(1)	90211	中小型船舶	中小型船舶
86368	HF-3058-(1)	90237	中小型船舶	中小型船舶
86369	HF-3455-(1)	90238	中小型船舶	中小型船舶
87860	HF-30814-(1)	87859	中小型船舶	中小型船舶
87864	HF-7279-(1)	87863	中小型船舶	中小型船舶
87870	HF-7997-(1)	87869	中小型船舶	中小型船舶
87876	HF-9277-(1)	87875	中小型船舶	中小型船舶
87977	HF-4238-(1)	87978	中小型船舶	中小型船舶
87979	HF-4316-(1)	87980	中小型船舶	中小型船舶
87987	HF-3479-(1)	87990	中小型船舶	中小型船舶
89943	HF-8979-(2)	87877	中小型船舶	中小型船舶
89944	HF-9159-(2)	87873	中小型船舶	中小型船舶
90142	HF-6445-(1)	90139	中小型船舶	中小型船舶
90160	HF-7010-(1)	90157	中小型船舶	中小型船舶
90212	HF-8988-(2)	90210	中小型船舶	中小型船舶

【図1K】

100388	HF-19301(1)	100392	小豆葉	Y13495		
100394	HF-19302(1)	100398	小豆葉	Y13496		
100401	HF-19305(1)	100404	小豆葉	Y13497		
100412	HF-19311(1)	100416	小豆葉	Y13498		
100428	HF-19317(1)	100432	小豆葉	Y13499		
100446	HF-20025(1)	100445	小豆葉	Y13500		
100452	HF-20027(1)	100455	小豆葉	Y13501		
100458	HF-20029(1)	100456	小豆葉	Y13502		
100503	HF-20059(1)	100561	小豆葉	Y13503		
100505	HF-20074(1)	100567	小豆葉	Y13504		
100575	HF-20075(1)	100573	小豆葉	Y13505		
100581	HF-20075(1)	100579	小豆葉	Y13506		
100587	HF-20077(1)	100585	小豆葉	Y13507		
100693	HF-20079(1)	100691	小豆葉	Y13508		
102061	HF-20053(1)	100548	小豆葉	Y13509		
103205	HF-20084(1)	100385	小豆葉	Y13510		
103233	HF-20048(1)	100329	小豆葉	Y13511		
103233	HF-20456(1)	100237	小豆葉	Y13512		
103398	HF-20418(1)	1002400	小豆葉	Y13513		
102402	HF-20441(1)	1002406	小豆葉	Y13514		
102408	HF-20444(1)	1002425	小豆葉	Y13515		
102743	HF-20482(1)	1002747	小豆葉	Y13516		
102749	HF-20488(1)	1002753	小豆葉	Y13517		
102773	HF-20490(1)	1002777	小豆葉	Y13518		
102785	HF-18789		小豆葉	Y13519		
102828	HF-20472(1)	100282	小豆葉	Y13520		
102834	HF-20486(1)	1002688	小豆葉	Y13521		
86457	HF-97975(1)	87805	小豆葉	Y13522		
98687	HF-18666(1)	58691	小豆葉	Y13523		
86448	HF-8740	87806	小豆葉	Y13524		
98711	HF-18694(1)	58715	小豆葉	Y13525		
98717	HF-18696(1)	58721	小豆葉	Y13526		
98735	HF-18702(1)	58739	小豆葉	Y13527		
98741	HF-18704(1)	58745	小豆葉	Y13528		
98759	HF-17693(1)	58758	小豆葉	Y13529		
101626	HF-20291(1)	101624	小豆葉	Y13530		
101646	HF-20297(1)	101642	小豆葉	Y13531		
101650	HF-20299(1)	101648	小豆葉	Y13532		
103639	HF-20695(1)	103637	小豆葉	Y13533		
94128	HF-17075(1)	54130	豆葉	Y13534		
94117	HF-17111(1)	54123	豆葉	Y13535		
94120	HF-17116(1)	54126	豆葉	Y13536		
94137	HF-17120(1)	54145	豆葉	Y13537		
94138	HF-17121(1)	54146	豆葉	Y13538		
92177	HF-17149(1)	52185	豆葉	Y13539		
94255	HF-17156(1)	54248	豆葉	Y13540		
94271	HF-17163(1)	54234	豆葉	Y13541		
99888	HF-19115(1)		豆葉	Y13542		

【図1L】

10073	HF-17064(1)	94082	豆葉			
94074	HF-17065(1)	94083	豆葉			
94327	HF-17186(1)	94330	豆葉			
94331	HF-17190(1)	94334	豆葉			
94291	HF-17232(1)	94299	豆葉			
94347	HF-17230(1)	94350	豆葉			
94175	HF-17119(1)	94178	豆葉			
92174	HF-17144(1)	92182	豆葉			
92176	HF-17147(1)	92183	豆葉			
94247	HF-17154(1)	94250	豆葉			
94259	HF-17158(1)	94262	豆葉			
94209	HF-17548(1)	94193	豆葉			
94444	HF-17581(1)	58869	豆葉			
94416	HF-17573(1)	94415	豆葉			
94440	HF-17554(1)	94439	豆葉			
94408	HF-17495(1)	58865	豆葉			
93216	HF-17975(1)	93220	豆葉			
88269	HF-18381(1)	98358	豆葉			
88224	HF-18369(1)	98222	豆葉			
88230	HF-18371(1)	98228	豆葉			
90236	HF-18373(1)	98234	豆葉			
88242	HF-18375(1)	98240	豆葉			
98421	HF-18336(1)	98419	豆葉			
97236	HF-18354(1)	97234	豆葉			
99943	HF-19350(1)	99951	豆葉			
100023	HF-19366(1)	100029	豆葉			
100031	HF-19368(1)	100025	豆葉			
100053	HF-19376(1)	100059	豆葉			
99905	HF-19376(1)	99907	豆葉			
99929	HF-19346(1)	99933	豆葉			
99977	HF-19352(1)	99981	豆葉			
99955	HF-19195(1)	99951	豆葉			
100061	HF-19378(1)	100065	豆葉			
100085	HF-19386(1)	100088	豆葉			
100091	HF-19388(1)	100099	豆葉			
100097	HF-19390(1)	100101	豆葉			
99997	HF-2039(1)	99995	豆葉			
100121	HF-19398(1)	100125	豆葉			
100127	HF-19400(1)	100131	豆葉			
100519	HF-19404(1)	100521	豆葉			
100531	HF-19408(1)	100535	豆葉			
115584	HF-17216(1)	115583	豆葉			
94445	HF-17351(2)	58869	豆葉			
94441	HF-17574(2)	94439	豆葉			
94166	HF-17192(4)		豆葉			
94174	HF-17110(4)		豆葉			
94646	HF-17165(4)		豆葉			
99809	HF-19119(4)		豆葉			

【図1M】

100525	HF-19404(1)		豆葉			
115582	HF-7113(1)		豆葉			
587244	HF-18084(2)	587245	豆葉			
587246	HF-18265(1)	587283	豆葉			
587246	HF-18275(1)	587287	豆葉			
587298	HF-18309(1)	587299	豆葉			
587388	HF-20387(1)	587389	豆葉			
587390	HF-20389(2)	587391	豆葉			

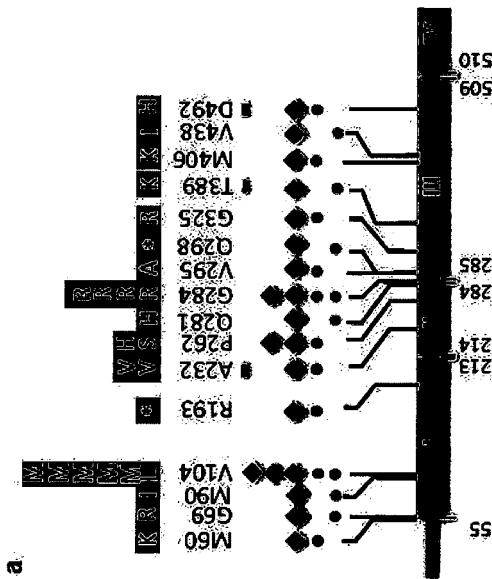
【図2A】

1 acitccagctt cgcgcgggg 9ggggcgcgc cgtagactca ccccttccct ctgcgttccct
 61 ccctccctt ctcttccttctt ctcaacacaca cacacccctt cccctgcattt cttcccccggg
 121 ctccggcttc cggccatggc ggatcttgcgc acatccctggc cggctcgccggc agcagccacc
 181 aatttcgcacg cogtttcaggc ggtcttcggc tctgatgtctt acgtcttgggg ccccccgggg
 241 ggacttccggc ggccgttccggc cggccatccggc cggccatccggc ggatcttccggc ggatcttccggc
 301 tggctggggc tggcttcggc cggccatccggc cggccatccggc ggatcttccggc tccggccatgg
 361 tggctggggc tggcttcggc cggccatccggc cggccatccggc ggatcttccggc tccggccatgg
 421 ctggccatccggc tggcttcggc cggccatccggc cggccatccggc ggatcttccggc tggctggggc
 481 ggacatccggc cggccatccggc tggcttcggc cggccatccggc ggatcttccggc tggctggggc
 541 ggccggatccg atggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 601 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 661 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 721 atggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 781 gggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 841 gtttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 901 ctggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 961 gtatggatggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1021 ttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1081 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1141 acgttccggcc attttcggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1201 atggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1261 acggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1321 ttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1381 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1441 acgttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1501 ttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1561 ttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1621 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1681 acggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1741 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1801 tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1861 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1921 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 1981 ggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2041 tccggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2101 atggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2161 ttttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2221 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2281 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2341 ctggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2401 tccggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2461 acatccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2521 ggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2581 qcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2641 ttttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2701 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2761 gtttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2821 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2881 acgttccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 2941 acatccggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3001 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3061 cggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3121 attttcggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3181 gcccggatccggc caccacggcc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3241 gggccatccggc cccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3301 ctggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc
 3361 tccggccatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc tggatccggc

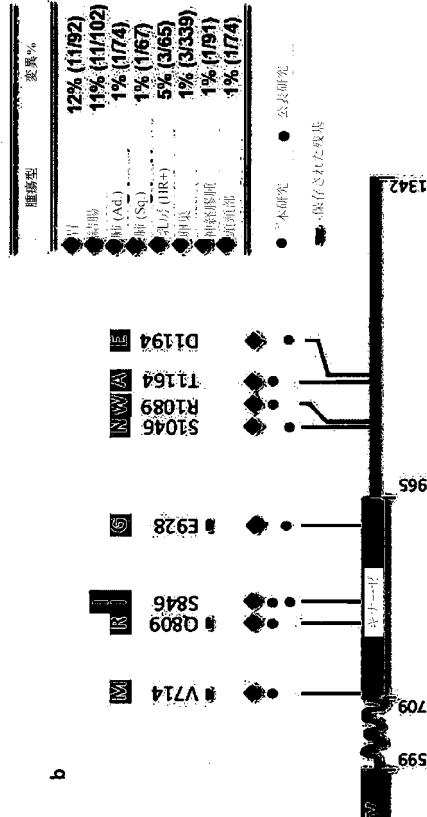
【 図 2 B 】

【図3】

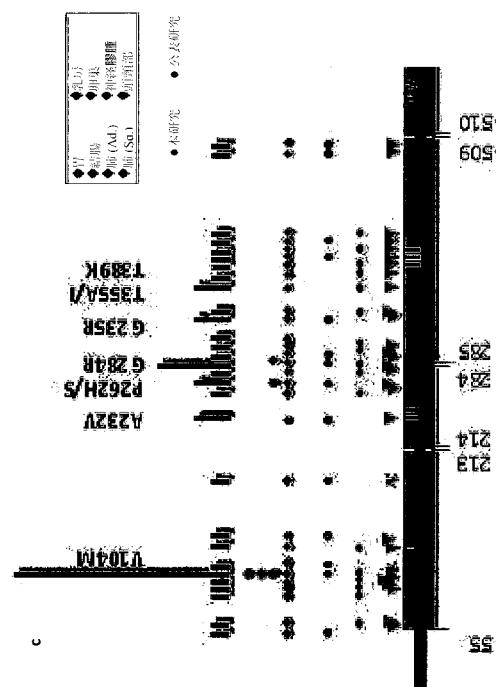
【 図 4 a 】



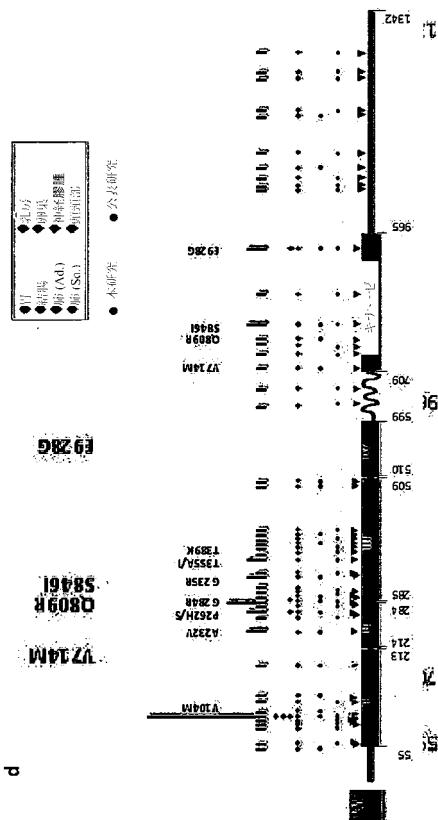
【 図 4 b 】



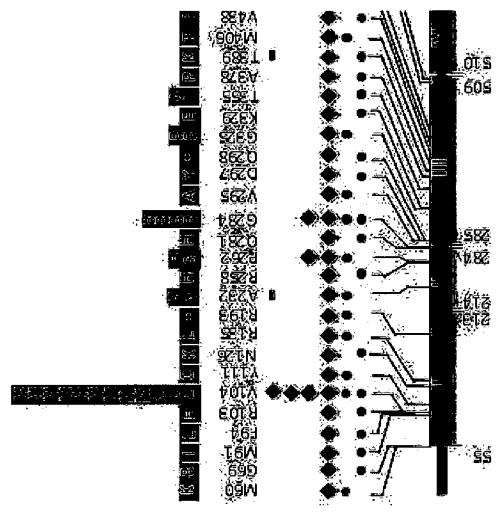
【図 4 c】



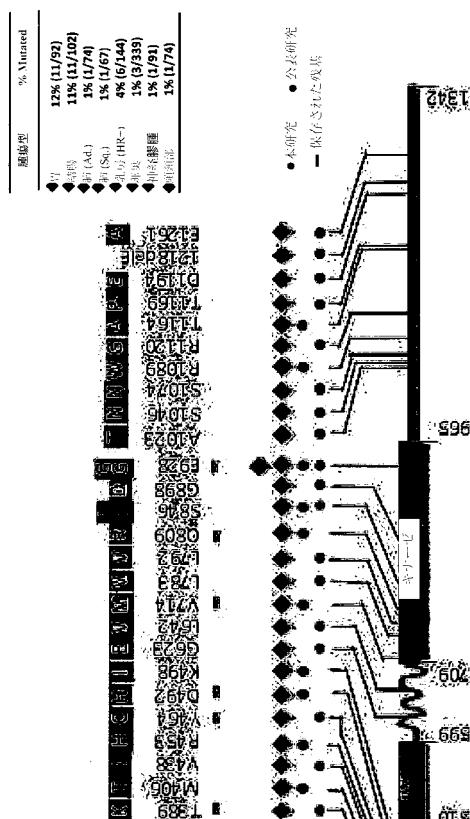
【図 4 d】



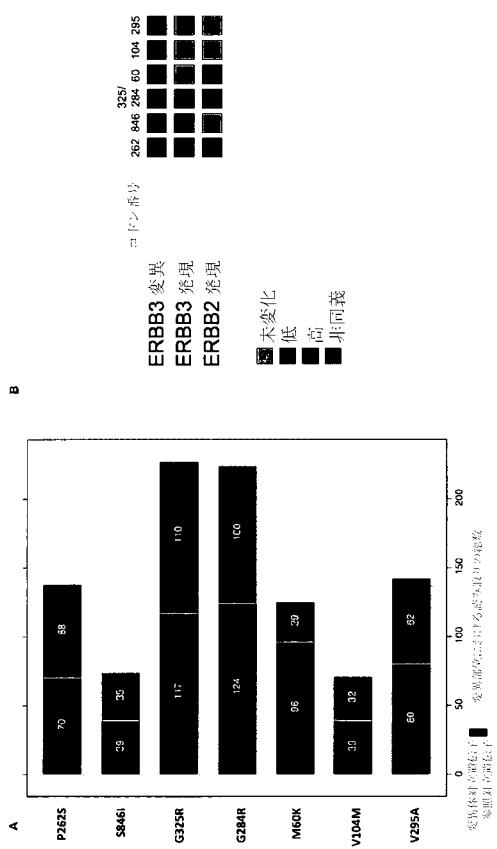
【図 4 e】



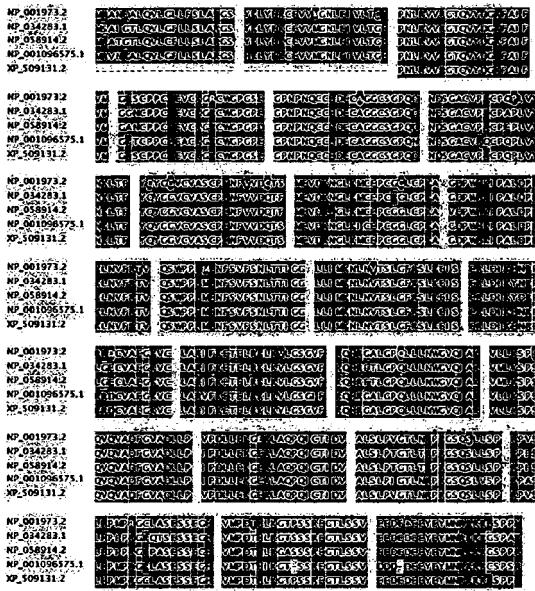
【図 4 f】



【図5】



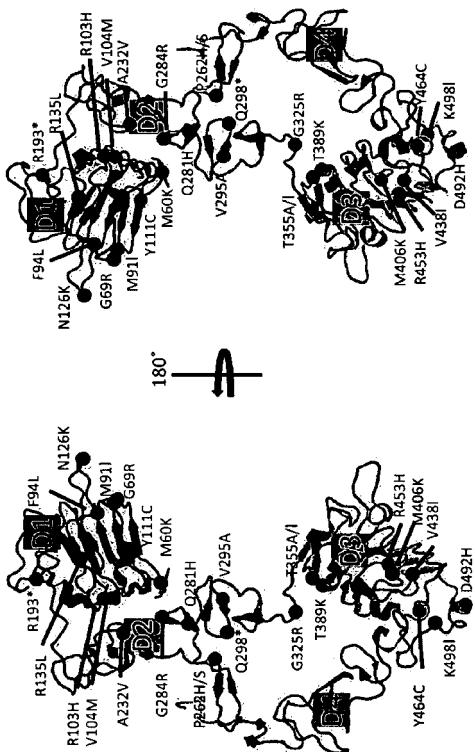
【図6】



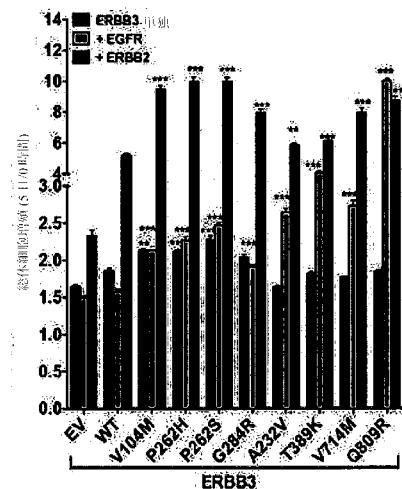
【図7】



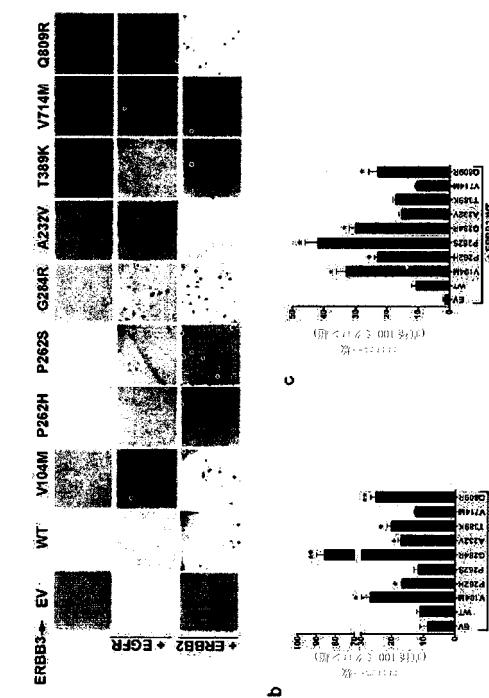
【図8】



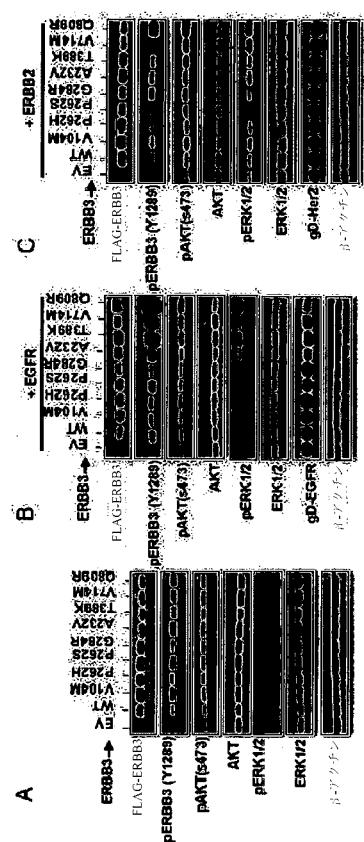
【図9】



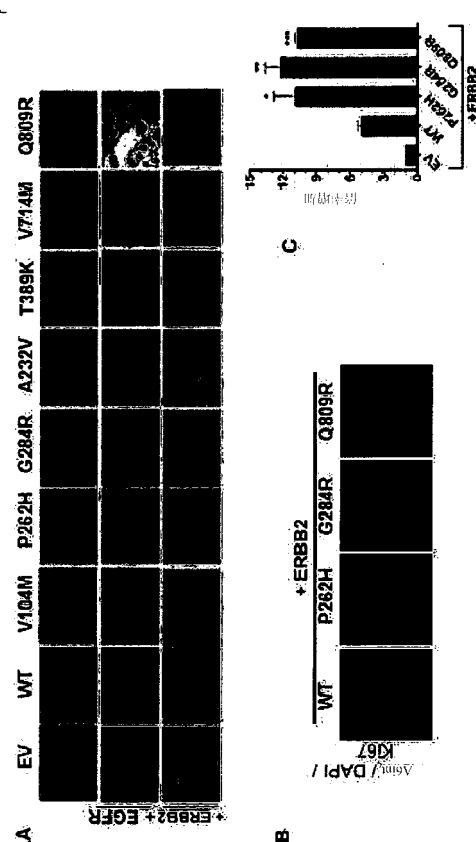
【図10】



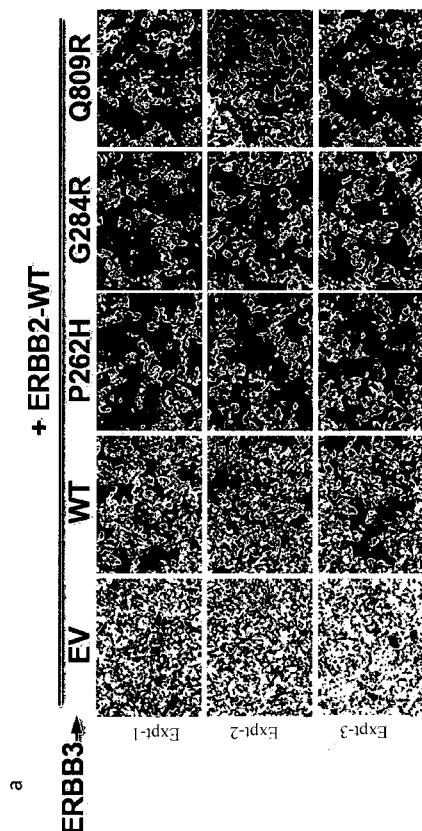
【図11】



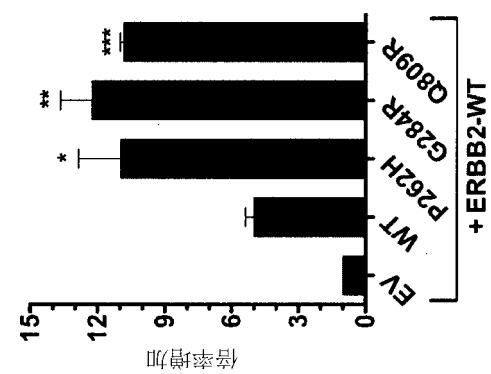
【図12】



【図 1 3 A (a)】

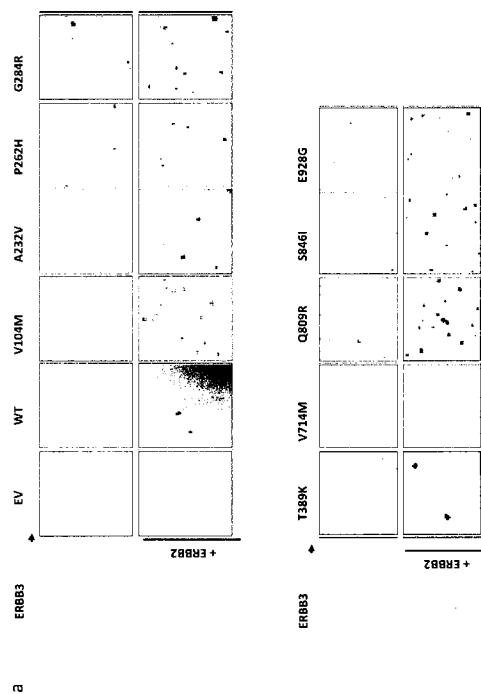


【図 1 3 A (b)】

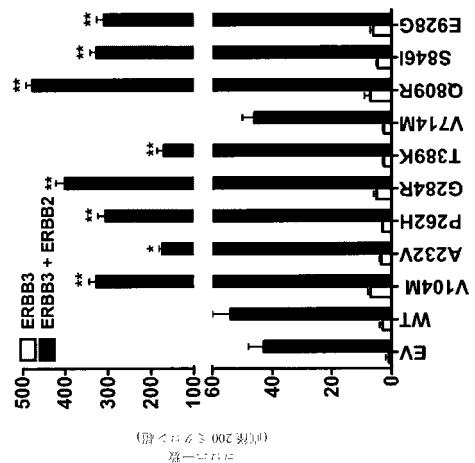


b

【図 1 3 B (a)】

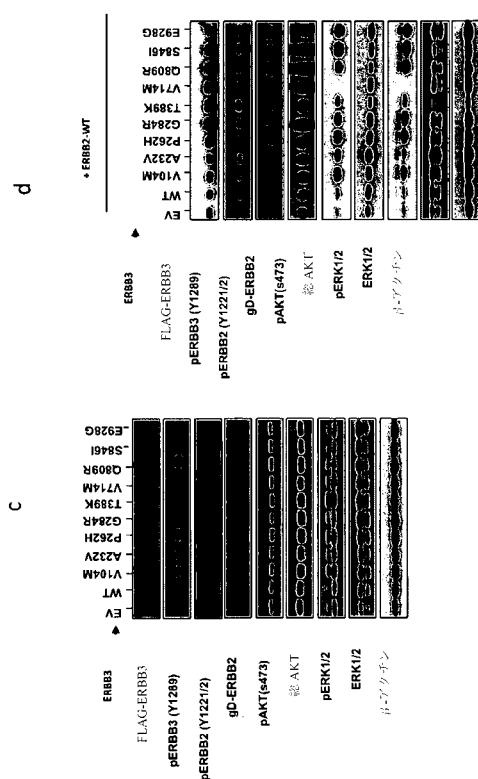


【図 1 3 B (b)】

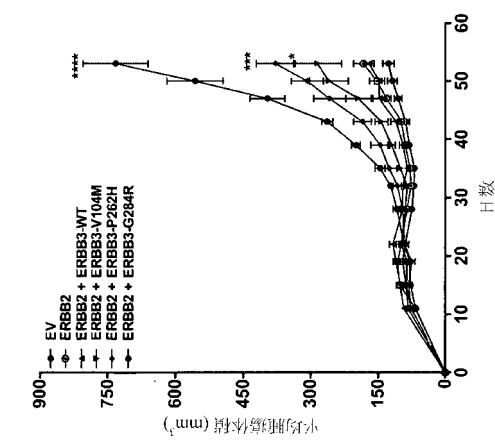


b

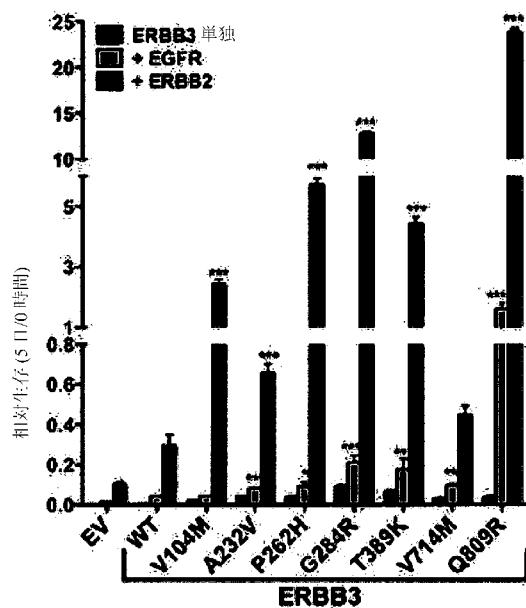
【図 13 B (c - d)】



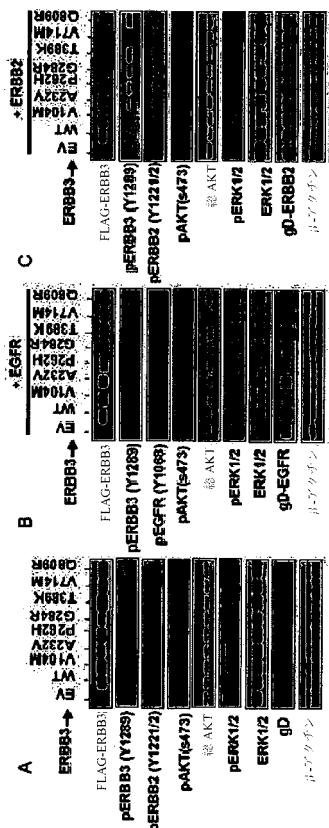
【図 13 B (e)】



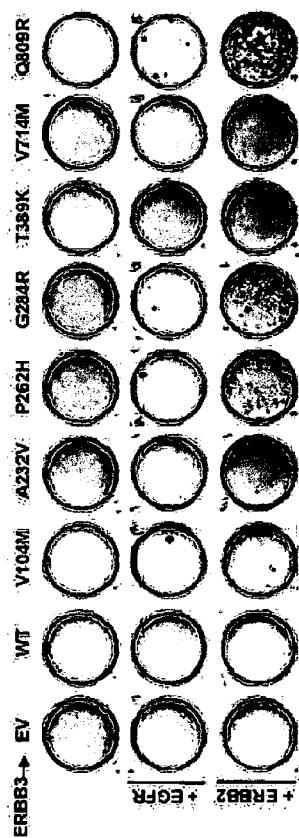
【図 14】



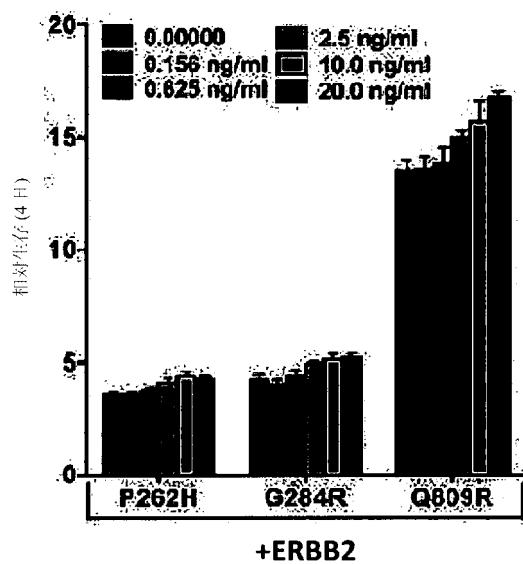
【図 15】



【図16】



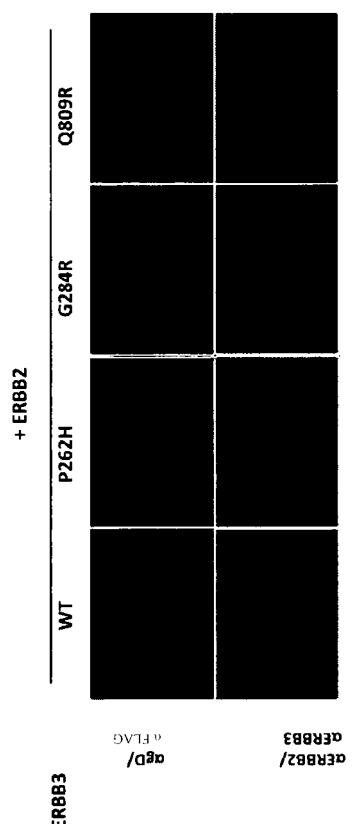
【図17】



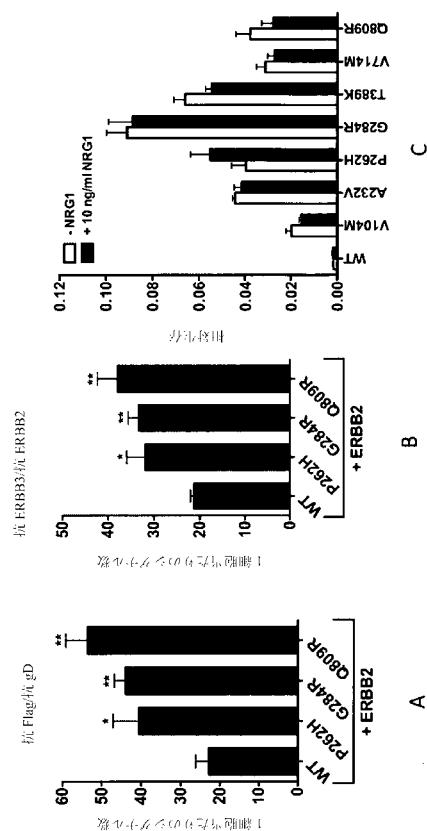
【図18】



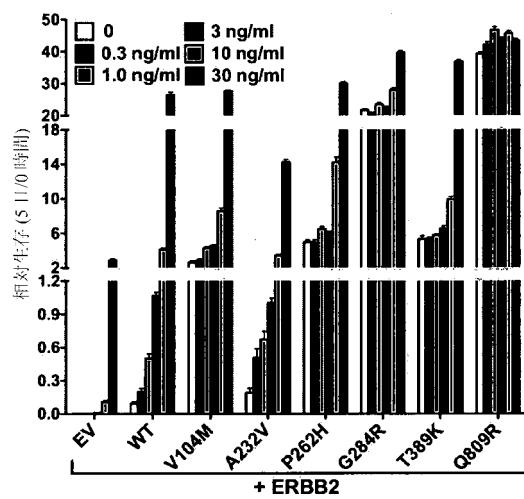
【図19】



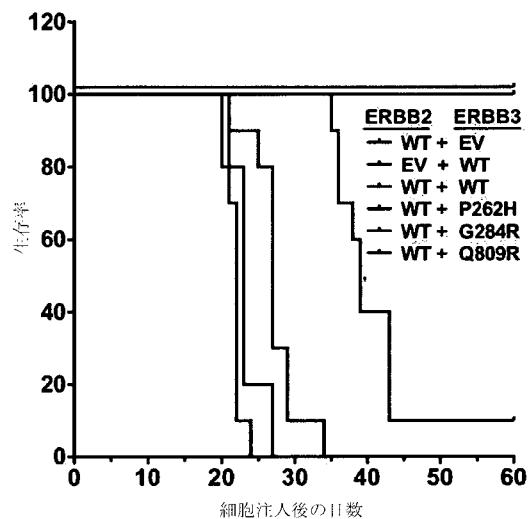
【図 2 0】



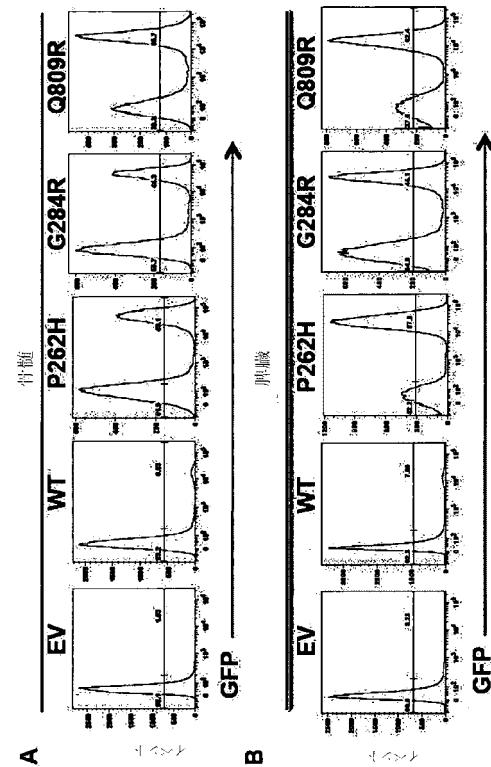
【図 2 1】



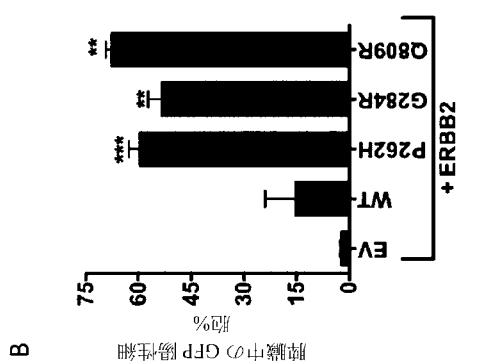
【図 2 2】



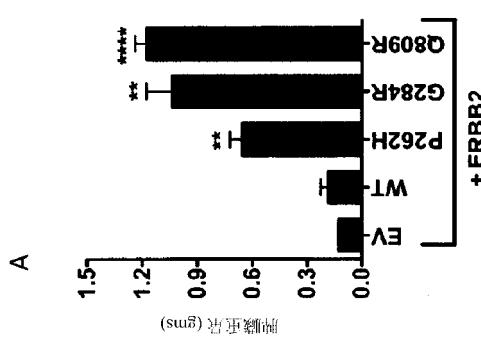
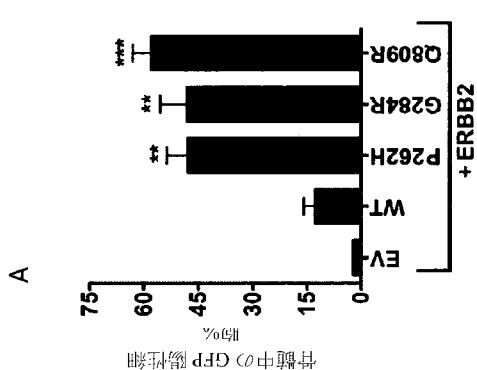
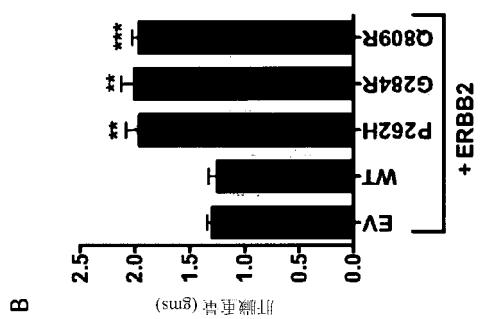
【図 2 3】



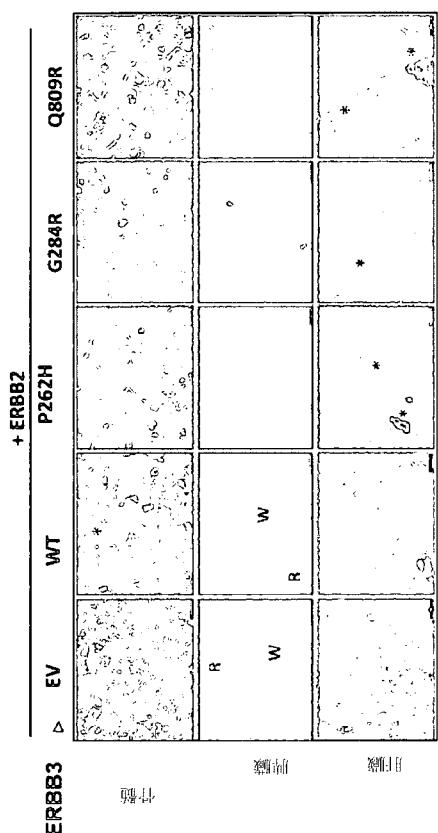
【図24】



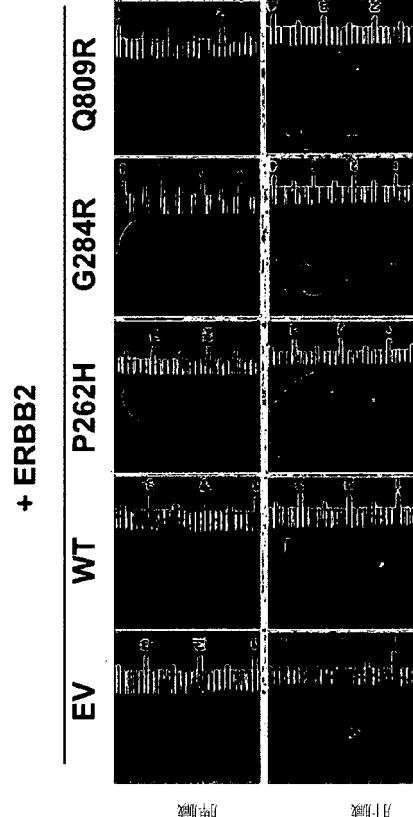
【図25】



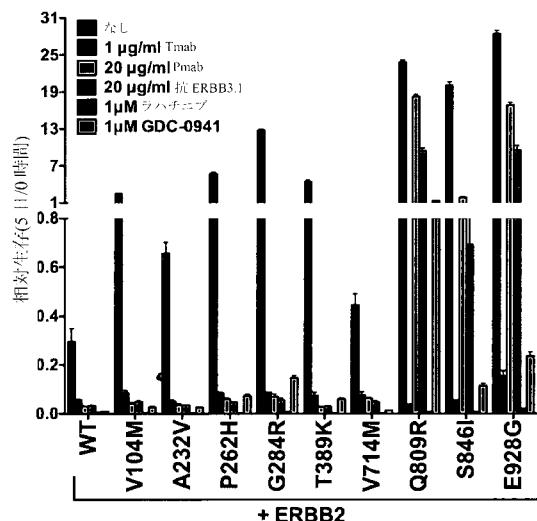
【図26】



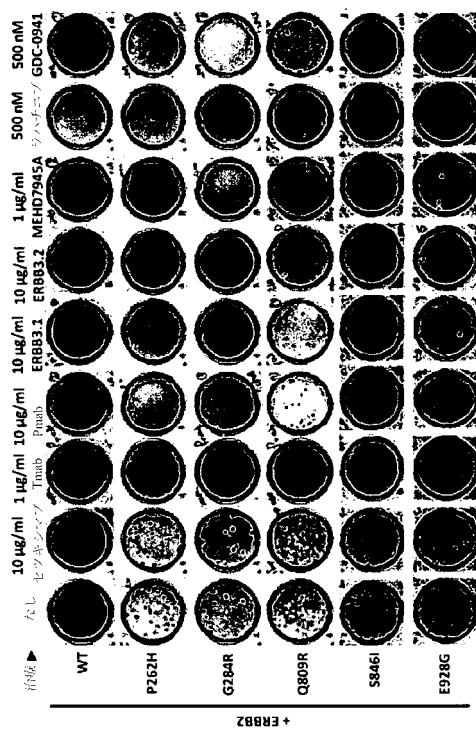
【図27】



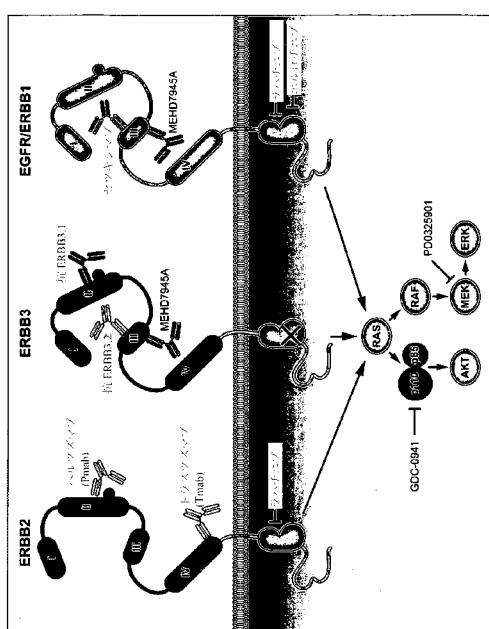
【図 28】



【図 29】

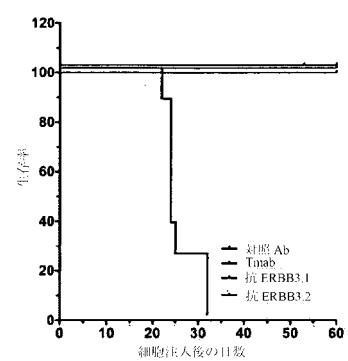


【図 30】

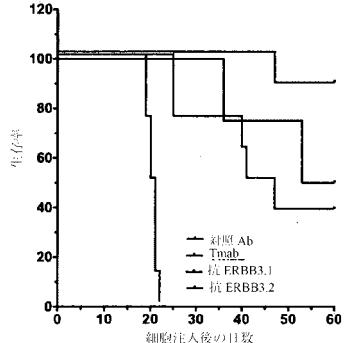


【図 31】

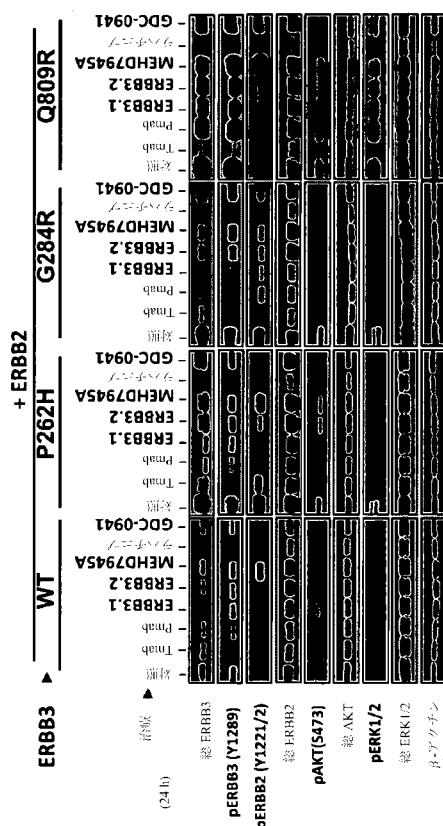
A



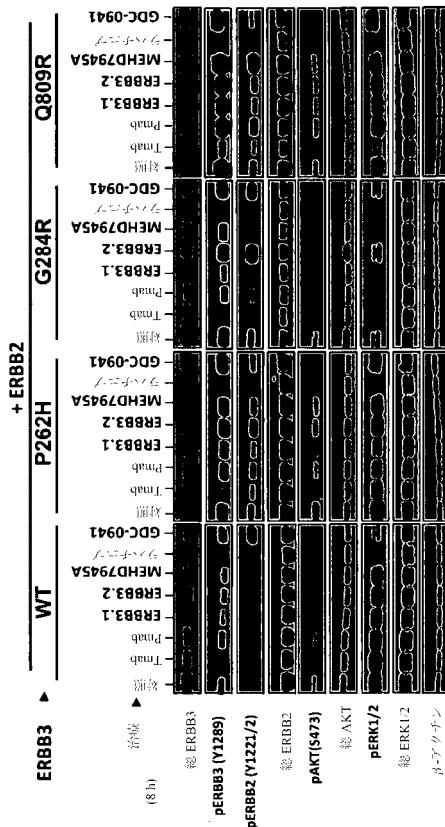
B



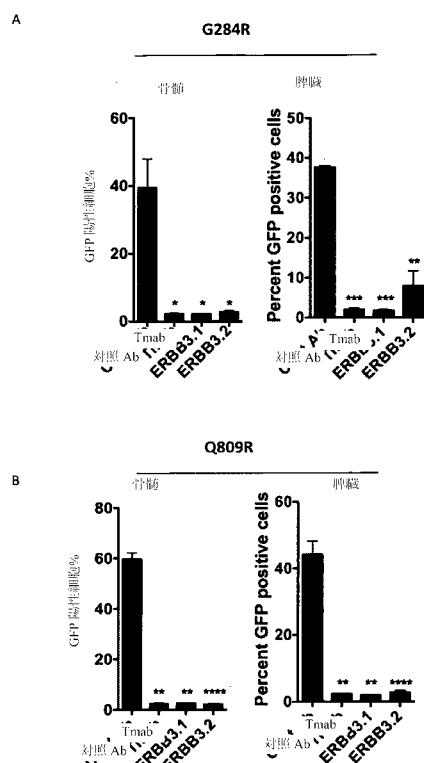
【図32】



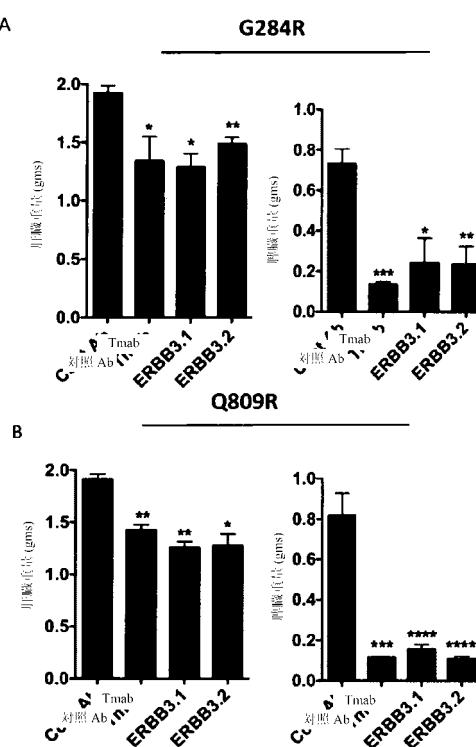
【図33】



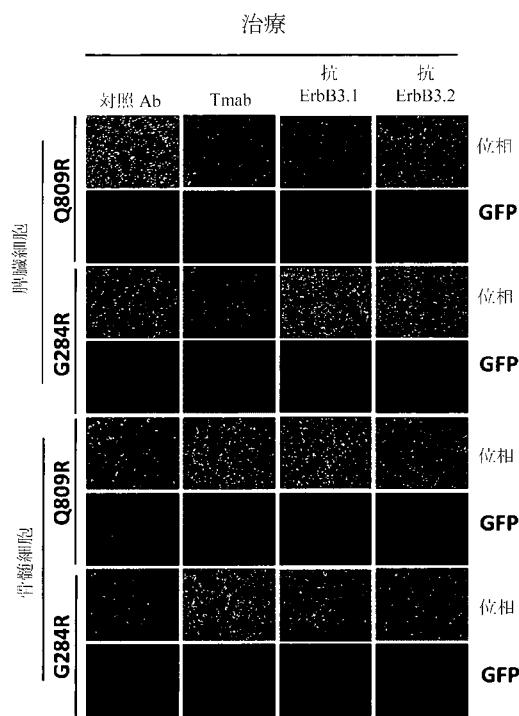
【図34】



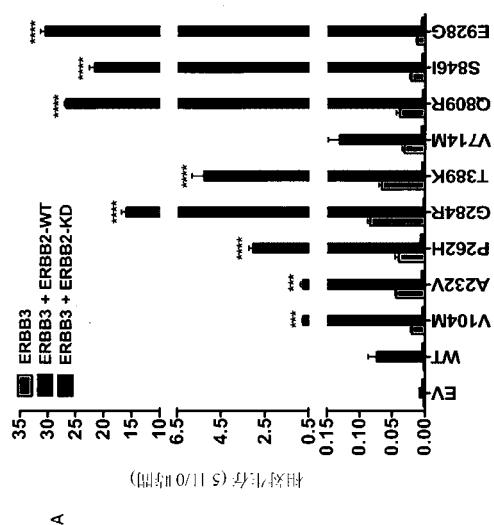
【図35】



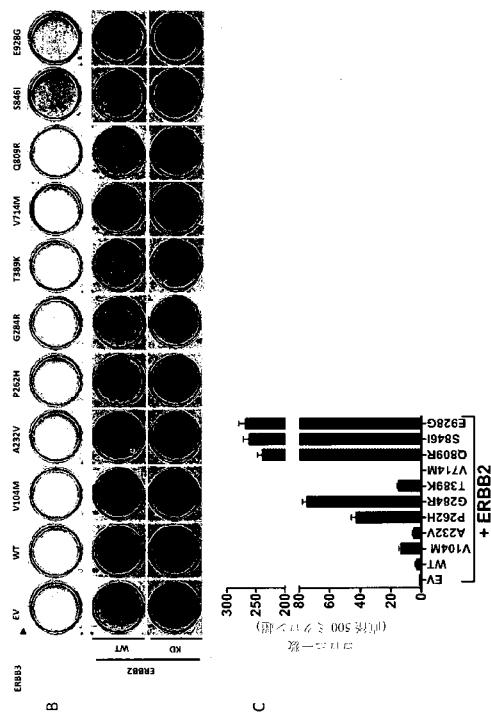
【図36】



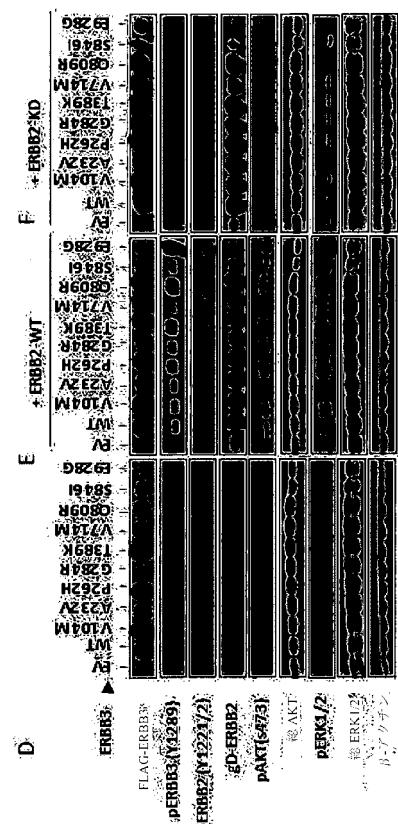
【図37(A)】



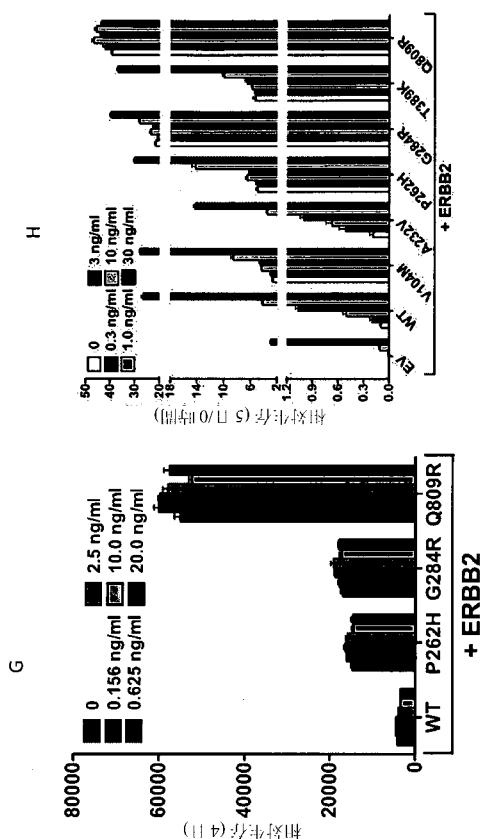
【図37(B-C)】



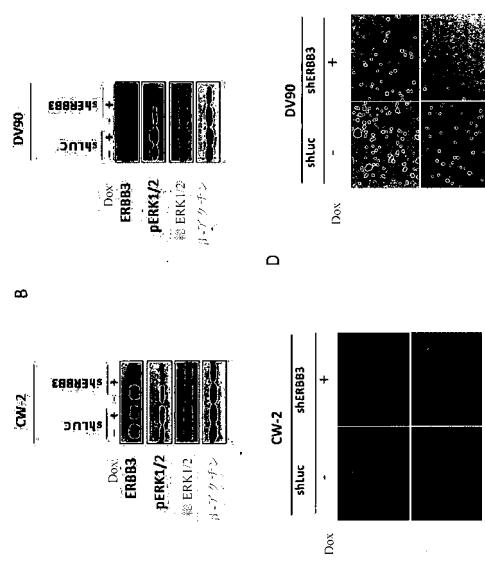
【図37(D-F)】



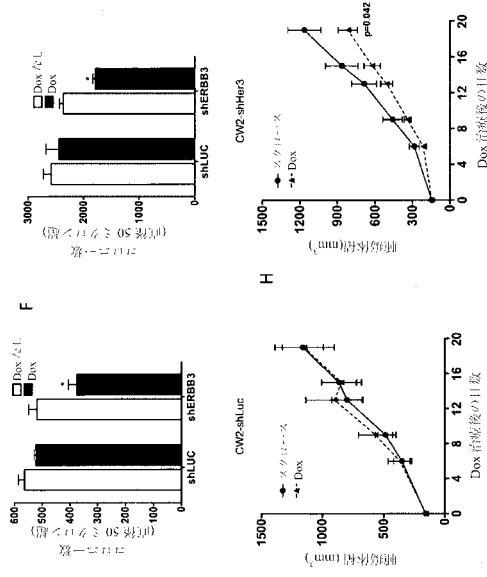
【図37 (G - H)】



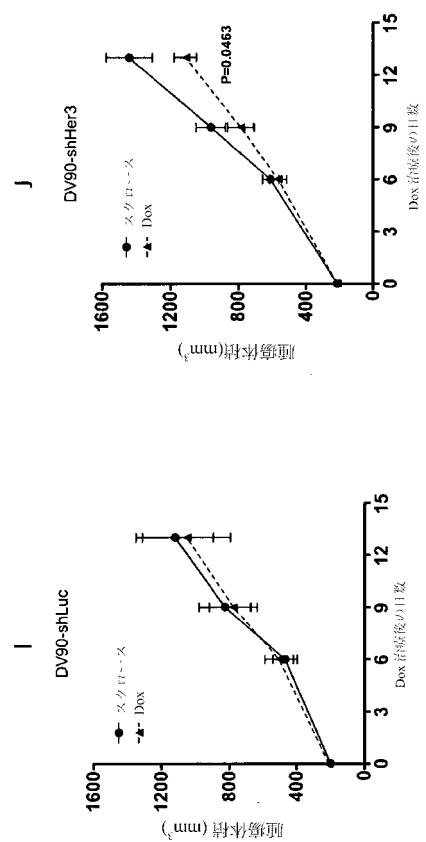
【図38 (A - D)】



【図38 (E - H)】



【図38 (I - J)】



【 図 3 9 - 1 】

【 図 3 9 - 2 】

【図39-3】

【配列表】

2015500638000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/000568

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2008/066498 A1 (AGENCY SCIENCE TECH & RES [SG]; ULLRICH AXEL [DE]; RUHE JENS [SG]; HAR) 5 June 2008 (2008-06-05) page 67/306 - page 68/306; figure 30 page 71/306; figure 30 page 102/306; figure 30 page 128/306; figure 31 page 131/306; figure 31 page 270/306; figure 32 page 274/306; figure 33 sequences 148-154, 589</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-33

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

13 May 2013

03/06/2013

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Guarinos Viñals, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/000568

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EUN GOO JEONG ET AL: "ERBB3 kinase domain mutations are rare in lung, breast and colon carcinomas", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 119, no. 12, 15 December 2006 (2006-12-15), pages 2986-2987, XP55062127, ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/ijc.22257 the whole document -----	1-33
X	WO 2008/061213 A2 (GENENTECH INC [US]; SESHAGIRI SOMASEKAR [US]; PETERS BROCK [US]; KAN Z) 22 May 2008 (2008-05-22) variant ID 3386; page 4/6; figure 3 -----	1-4, 7-13, 15-23, 26-31,33
A	WO 03/011897 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]; SINGER ELIZABETH [US]; LANDGRAF RALF [US]; SLAMO) 13 February 2003 (2003-02-13) -----	1-33
A	SITHANANDAM G ET AL: "The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy", CANCER GENE THERAPY, NORWALK, CT, US, vol. 15, no. 7, 11 April 2008 (2008-04-11), pages 413-448, XP002504880, ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/CGT.2008.15 [retrieved on 2008-04-11] -----	1-33
A	DING LI ET AL: "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 455, no. 7216, 23 October 2008 (2008-10-23), pages 1069-1075, XP002597660, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE07423 -----	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/000568

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008066498	A1	05-06-2008	EP 2094850 A1 JP 2010511382 A SG 177225 A1 US 2011008347 A1 WO 2008066498 A1	02-09-2009 15-04-2010 30-01-2012 13-01-2011 05-06-2008
WO 2008061213	A2	22-05-2008	AT 527385 T AU 2007319214 A1 CA 2667851 A1 EP 2082064 A2 ES 2374954 T3 JP 2010509922 A US 2010092965 A1 WO 2008061213 A2	15-10-2011 22-05-2008 22-05-2008 29-07-2009 23-02-2012 02-04-2010 15-04-2010 22-05-2008
WO 03011897	A1	13-02-2003	US 2003143568 A1 US 2006177907 A1 WO 03011897 A1	31-07-2003 10-08-2006 13-02-2003

フロントページの続き

(51) Int.CI. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 35/00

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 セシャギリ, ソマセカ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080, サウス サンフランシスコ, ディーエヌエー
ウェイ 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 CA09 CA20 HA11 HA12
4B063 QA01 QA17 QQ02 QQ27 QQ42 QQ58 QR08 QR14 QR20 QR42
QR55 QR62 QS25 QS26 QS32
4C084 AA17 NA14 ZB262 ZC412
4C085 AA13 AA14 AA16 CC23