

(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 I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B 0 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 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)
 (86) (22) 出願日 平成24年11月29日 (2012.11.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年7月24日 (2014.7.24)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/000568
 (87) 国際公開番号 W02013/081645
 (87) 国際公開日 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)

(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
 (74) 代理人 100109726
 弁理士 園田 吉隆
 (74) 代理人 100101199
 弁理士 小林 義教
 (72) 発明者 ジェイスワール, ビージェイ シャンカル
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, デ
 ィーエヌエー ウェイ 1

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	Sex	Age	Primary Site	Primary Site	Primary Site	Primary Site	Primary Site
10038	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10039	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10040	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10041	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10042	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10043	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10044	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10045	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10046	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10047	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10048	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10049	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10050	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10051	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10052	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10053	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10054	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10055	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10056	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10057	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10058	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10059	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10060	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10061	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10062	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10063	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10064	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10065	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10066	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10067	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10068	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10069	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10070	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10071	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10072	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10073	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10074	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10075	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10076	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10077	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10078	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10079	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10080	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10081	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10082	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10083	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10084	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10085	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10086	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10087	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10088	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10089	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10090	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10091	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10092	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10093	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10094	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10095	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10096	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10097	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10098	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10099	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon
10100	Male	55	Colon	Colon	Colon	Colon	Colon

【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 2 5 0 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 2 5 0 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 1 0 4、8 0 9、2 3 2、2 6 2、2 8 4、3 2 5、8 4 6、9 2 8、6 0、1 1 1、1 3 5、2 9 5、4 0 6、4 5 3、4 9 8、1 0 8 9、および 1 1 6 4 からなる群から選択される位置のアミノ酸、または (i i) 1 9 3 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す、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 1 0 4、8 0 9、2 3 2、2 6 2、2 8 4、3 2 5、8 4 6、9 2 8、6 0、1 1 1、1 3 5、2 9 5、4 0 6、4 5 3、4 9 8、1 0 8 9、1 1 6 4、および 1 9 3 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 1 0 4、8 0 9、2 3 2、2 6 2、2 8 4、3 2 5、8 4 6、9 2 8、6 0、1 1 1、1 3 5、2 9 5、4 0 6、4 5 3、4 9 8、1 0 8 9、1 1 6 4、1 9 3、4 9 2、および 7 1 4 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、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、E G F R 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 E G F R / 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 13】

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 12 に記載の方法。

【請求項 14】

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 15】

前記 ErbB3 癌が、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、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、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 16】

(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 17】

前記検出が、前記変異を増幅するか、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 18】

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鋳型と混合することを含む、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 19】

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、前記核酸鋳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 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ポリメラーゼおよび前記核酸鋳型を含む DNA 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 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記変異が、前記生体試料から単離されたゲノム DNA 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 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、請求項 17 に記載の方法。

30

【請求項 22】

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 17 に記載の方法。

【請求項 23】

前記増幅が、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、前記 PCR、RT-PCR、または LCR における鋳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を含む、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 24】

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 ErbB3 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 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す、前記変異が、前記対象における ErbB3 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 25】

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、

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す、前記変異の存在が

10

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、および脾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】

40

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

50

胞外ドメイン (ECD)、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))。ECDは、2つのLドメイン (IおよびIII) ならびに2つの高システインドメイン (IIおよびIV) 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))。ERBB受容体は、上皮成長因子 (EGF)、形質転換成長因子 - (TGF-)、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III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II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)、Ogiso 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II二量体化アームは、ドメインIV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ERBB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な研究は、ERBB2が既知のERBBファミリーリガンドのいずれにも結合せず、構造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、ERBB3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))。ERBB2およびERBB3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】

ERBB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 Bi

ology 21, 177 - 184 (2009))。具体的には、受容体過剰発現をもたら
 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EGF
 R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 - 3
 8 (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)、Alvare
 z 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 Review
 s 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 (200
 9))。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 Cance
 r 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。

10

20

30

【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ビボで促進する
 という証拠がある。

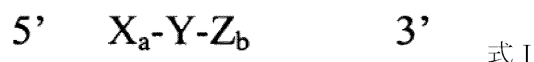
【0007】

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、Erbb
 3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

40



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、1
 089、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

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ErbB3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ErbB3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、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、この変異は、対象におけるErbB3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ErbB3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、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ErbB3癌を示す。別の実施形態では、ErbB3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、および膵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ErbB阻害剤である。他の実施形態では、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。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鋳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、核酸鋳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鋳型を含む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における鋳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

【0013】

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、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す、この変異は、ErbB3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

【0014】

一態様では、本発明は、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、a) 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、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す、変異の存在は、対象におけるErbB3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、ErbB3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

【0015】

別の態様では、治療方法は、ErbB3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、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。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

【0016】

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ErbB3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、ErbB3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

【0017】

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ErbB3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ErbB3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、E r b B 3 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、E r b B 拮抗薬に応答する可能性のあるE r B B 3 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み、この変異は、V 1 0 4、Y 1 1 1、A 2 3 2、P 2 6 2、G 2 8 4、T 3 8 9、およびQ 8 0 9 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、E r b B 3 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E r 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、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ステップを含み、この変異は、M 6 0、R 1 9 3、A 2 3 2、P 2 6 2、V 2 9 5、G 3 2 5、M 4 0 6、D 4 9 2、V 7 1 4、Q 8 0 9、R 1 0 8 9、T 1 1 6 4 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E r b B 3 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E r b B 3 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、V 1 0 4、Y 1 1 1、A 2 3 2、P 2 6 2、G 2 8 4、T 3 8 9、およびQ 8 0 9 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。

【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、E r b B 阻害剤である。別の実施形態では、このE r b B 阻害剤は、E G F R 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E G F R / E r b B 3 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、E r b B 阻害剤は、E G F R 拮抗薬である。他の実施形態では、E r b B 阻害剤は、E r b B 2 拮抗薬である。他の一実施形態では、E r b B 阻害剤は、E r b B 3 拮抗薬である。別の一実施形態では、E r b B 阻害剤は、E r b B 4 拮抗薬である。いくつかの実施形態では、E r b B 阻害剤は、E G F R / E r b B 3 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鋳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、核酸鋳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鋳型を含む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における鋳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。

10

【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。

20

【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。

30

【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)。

40

【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

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 4 c】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 4 d】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 4 e】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 4 a、c、および e は、N 末端の半分を示し、図 4 b、d、および f は、C 末端の半分を示す。

【図 4 f】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 4 a、c、および e は、N 末端の半分を示し、図 4 b、d、および f は、C 末端の半分を示す。

【図 5】RNA 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 (S e s h a g i r i , S . e t a l . C o m p r e h e n s i v e a n a l y s i s o f c o l o n c a n c e r g e n o m e s i d e n t i f i e s r e c u r r e n t m u t a t i o n s a n d R - s p o n d i n f u s i o n s . (M a n s u s c r i p t i n P r e p a r a t i o n 2 0 1 1)) 。

【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 . s a p i e n s) (N P _ 0 0 1 9 7 3 . 2 (完全長配列は、配列番号 1 2 6 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 1 3 2 ~ 1 5 1 として開示される))、チンパンジー (P . t r o g l o d y t e s) (X P _ 5 0 9 1 3 1 . 2 (完全長配列は、配列番号 1 3 0 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 2 1 2 ~ 2 2 9 として開示される))、ハイイロオオカミ (C . l u p u s) (X P _ 5 3 8 2 2 6 . 2 (配列番号 1 3 1))、ウシ (B . t a u r u s) (N P _ 0 0 1 0 9 6 5 7 5 . 1 (完全長配列は、配列番号 1 2 9 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 1 9 2 ~ 2 1 1 として開示される))、ハツカネズミ (M . m u s c u l u s) (N P _ 0 3 4 2 8 3 . 1 (完全長配列は、配列番号 1 2 7 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 1 5 2 ~ 1 7 1 として開示される))、およびラット (R . n o r v e g i c u s) (N P _ 0 5 8 9 1 4 . 2 (完全長配列は、配列番号 1 2 8 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 1 7 2 ~ 1 9 1 として開示される)) を、C l u s t a l W を用いて整列させた (L a r k i n , M . A . e t a l . B i o i n f o r m a t i c s (O x f o r d , E n g l a n d) 2 3 , 2 9 4 7 ~ 2 9 4 8 (2 0 0 7)) 。

【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

10

20

30

40

50

【図 8】ドメイン別に色付けされた E R B B 3 (p d b 1 M 6 B) の E C D 結晶構造上にマップされる、E R B B 3 体細胞変異。

【図 9】E R B B 3 変異は、3 D 培地における M C F 1 0 A 細胞の E G F 非依存性増殖を支援する。単独または E G F R もしくは E R B B 2 のいずれかと一緒に E R B B 3 変異体を安定的に発現する M C F 1 0 A 細胞は、E G F 非依存性増殖を示す。M C F 1 0 A を必要とする研究は、血清、E G F、および N R G 1 の不在下で行った。E V - 空ベクター。

【図 1 0】E R B B 3 変異体は、E G F 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 E G F R もしくは E R B B 2 との組み合わせのいずれかで、E R B B 3 を発現する M C F 1 0 A 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、E R B B 3 変異体について E G F R (b) または E R B B 2 (c) との組み合わせで示される。

【図 1 1】単独 (A) または E G F R (B) もしくは E R B B 2 (C) のいずれかと一緒に E R B B 3 変異体を安定的に発現する M C F 1 0 A 細胞は、ウェスタンブ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。M C F 1 0 A を必要とする研究は、血清、E G F、および N R G 1 の不在下で行った。E V - 空ベクター。

【図 1 2】E R B B 3 変異は、3 D 培地における M C F 1 0 A 細胞の E G F 非依存性増殖を支援する。単独または E G F R もしくは E R B B 2 のいずれかと一緒に E R B B 3 変異体を安定的に発現する M C F 1 0 A 細胞は、E R B B 3 / E R B B 2 を発現する M C F 1 0 A 細胞と比較して、大きな腺房構造、K i 6 7 染色の増加、および移行指数の増加を示す。データは、3 つの独立した実験の平均 ± 標準誤差を表す。M C F 1 0 A を必要とする研究は、血清、E G F、および N R G 1 の不在下で行った。E V - 空ベクター。

【図 1 3 A (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、E R B B 2 と共に表示の E R B B 3 変異体を発現する M C F 1 0 A 細胞の代表的な画像を示す。

【図 1 3 A (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、E R B B 2 と共に表示の E R B B 3 変異体を発現する M C F 1 0 A 細胞の代表的な画像を示す。

【図 1 3 B (a)】E R B B 3 変異体が、I M C E 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。E R B B 3 自体または E R B B 2 との組み合わせのいずれかで発現する I M C E コロニー上皮細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する I M C E 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)、およびインビボ増殖 (e) を示した。E V - 空ベクター。

【図 1 3 B (b)】E R B B 3 変異体が、I M C E 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。E R B B 3 自体または E R B B 2 との組み合わせのいずれかで発現する I M C E コロニー上皮細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する I M C E 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)、およびインビボ増殖 (e) を示した。E V - 空ベクター。

【図 1 3 B (c - d)】E R B B 3 変異体が、I M C E 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。E R B B 3 自体または E R B B 2 との組み合わせのいずれかで発現する I M C E コロニー上皮細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する I M C E 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)、およびインビボ増殖 (e) を示した。E V - 空ベクター。

【図 1 3 B (e)】E R B B 3 変異体が、I M C E 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。E R B B 3 自体または E R B B 2 との組み合わせのいずれかで発現する I M C E コロニー上皮細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 を発現する I M C E 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)、およびインビボ増殖 (e) を示した。E V - 空ベクター。

【図 1 4】E R B B 3 変異体は、形質転換し、B a F 3 細胞の I L 3 非依存性生存を促進する。単独または E G F R もしくは E R B B 2 のいずれかと一緒に E R B B 3 変異体を安定的に発現する B a F 3 細胞は、I L 3 非依存性生存を促進する。B a F 3 研究は、I L

10

20

30

40

50

- 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 1 5】E R B B 3 変異体は、形質転換し、B a F 3 細胞の I L 3 非依存性生存を促進する。単独 (A) または E G F R (B) もしくは E R B B 2 (C) のいずれかと一緒に E R B B 3 変異体を安定的に発現する B a F 3 細胞は、E R B B 3 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。B a F 3 研究は、I L - 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 1 6】単独または E G F R もしくは E R B B 2 との組み合わせのいずれかで、E R B B 3 変異体を安定的に発現する B a F 3 細胞の足場非依存性増殖の代表的画像。B a F 3 研究は、I L - 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

10

【図 1 7】抗 N R G 1、N R G 1 中和抗体は、E R B B 2 と共発現した E R B B 3 変異体により促進される B a F 3 細胞の I L - 3 非依存性生存に影響を及ぼさない。B a F 3 研究は、I L - 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 1 8】B S 3 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、N R G 1 の不在下で、B a F 3 細胞における E R B B 3 変異体 / E R B B 2 ヘテロ二量体の上昇レベル。B a F 3 研究は、I L - 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 1 9】近接結紮アッセイ 4 0 を使用して検出される細胞表面上で観測されるとおり、N R G 1 の不在下で、B a F 3 細胞における E R B B 3 変異体 / E R B B 2 ヘテロ二量体の上昇レベル。B a F 3 研究は、I L - 3 および N R G 1 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

20

【図 2 0】E R B B 3 - E R B B 2 ヘテロ二量体の定量化。近接結紮アッセイからの画像 (図 1 7) を、D u o l i n k 画像ソフトウェアツール (U p p s a l a , S w e d e n) を使用して分析した。E R B B 3 および E R B B 2 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 1 0 0 個の細胞を、E R B B 2 / E R B B 3 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、F L A G (E R B B 3) および g D (E R B B 2) 抗体 (A) または天然の E R B B 3 および E R B B 3 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 2 0 C は、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かったことを示す。

30

【図 2 1】E R B B 3 E C D 変異体は、異なる用量の外因性リガンド N R G 1 に応答して、増加した I L - 3 非依存性 B a F 3 生存を示す。B a F 3 研究は、I L - 3 の不在下で行った。E V = 空ベクター、M = モノマー、および D = 二量体。

【図 2 2】E R B B 3 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 E R B B 3 変異体 / E R B B 2 の組み合わせを発現する B a F 3 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 B a F 3 (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 = 1 0、ログランク検定 p < 0 . 0 0 0 1) 。

【図 2 3】様々な E R B B 3 変異体 / E R B B 2 - W T を発現する G F P 標識された B a F 3 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。

40

【図 2 4】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 G F P 陽性細胞の平均数が示される。

【図 2 5】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 2 6】図 2 1 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 = 赤脾髄、W = 白脾髄のリンパ濾胞。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 / 白脾髄構造の喪失がある。スケール

50

バーは、100 μ m 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変異体をインビ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、骨髓(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髓から単離された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、ウェスタンブロット。

【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)ERBB3ECD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

る。(A~J)DOX誘導時にshRNAを標的とする誘導ERBB3を安定的に発現するCW-2およびDV-90は、非誘導細胞(A~F)またはshRNA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ERBB3およびpERK(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38(E-H)】shRNA媒介性ERBB3ノックダウンは、腫瘍増殖を遅延させる。(A~J)DOX誘導時にshRNAを標的とする誘導ERBB3を安定的に発現するCW-2およびDV-90は、非誘導細胞(A~F)またはshRNA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ERBB3およびpERK(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38(I-J)】shRNA媒介性ERBB3ノックダウンは、腫瘍増殖を遅延させる。(A~J)DOX誘導時にshRNAを標的とする誘導ERBB3を安定的に発現するCW-2およびDV-90は、非誘導細胞(A~F)またはshRNA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ERBB3およびpERK(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39-1】Erbb3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39-2】Erbb3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39-3】Erbb3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】

【0025】

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。

10

20

【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場合、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、ホスホロチオエート、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）のペンダ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ル基のいずれかは、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

40

50

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(O)R、P(O)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变化」、「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変形は、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】

「増幅」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。増幅は、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、必ずしも鋳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、鋳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/または増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」とであると言われる。

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

【 0 0 4 7 】

「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。

【 0 0 4 8 】

「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。

【 0 0 4 9 】

「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。

【 0 0 5 0 】

「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。

【 0 0 5 1 】

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、癌の発症に相関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。

【 0 0 5 2 】

「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）。

【 0 0 5 3 】

「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。

【 0 0 5 4 】

「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試の薬物に好ましく、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。

【 0 0 5 5 】

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、リボソームドキシソルピシン、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。

【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、チオテバおよび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、およびビボ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（TELCYT A（商標））；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；-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））；-ラバコン；ラバコール；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、CAMPOTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン、および9-アミノカンプトテシンを含む）；プリオスタチン；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；テニボシド；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）；エレウテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；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、イフォスファミド、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、ノベムピチン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；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II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、アルカルピシン、ダウノルピシン、デクスラゾキサン、DX-52-1、エビルピシン、GPX-100、イ

10

20

30

40

50

ダルビシン、K R N 5 5 0 0、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、A D R I A M Y C I N（登録商標）、ドキシソルビシン（モルホリノ - ド
 キソルビシン、シアノモルホリノ - ドキシソルビシン、2 - ピロリノ - ドキシソルビシン、リ
 ポソームドキシソルビシン、およびデオキシドキシソルビシンを含む）、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（r o d o r u b i c i n）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン
 、ツベルシジン（t u b e r c i d i n）、ウベニメクス、ジノスタチン（z i n o s t
 a t i n）、およびゾルビシン（z o r u b i c i n）等のアントラサイクリン；デノプ
 テリン（d e n o p t e r i n）、プテロプテリン（p t e r o p t e r i n）、および
 トリメトレキセート（t r i m e t r e x a t e）、等の葉酸類似体；フルダラビン（f
 l u d a r a b i n e）、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（a z a c i t i d i n e）、6 - アザウ
 リジン（a z a u r i d i n e）、カルモフル、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（e n o c i t a b i n e）、およびフロキシウリジン（
 f l o x u r i d i n e）等のピリミジン類似体；カルステロン（c a l u s t e r o n
 e）、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、およびテ
 ストラクトン（t e s t o l a c t o n e）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ル、フォリン酸（ロイコボリン）等の葉酸補
 液；アセグラトン；A L I M T A（登録商標）等の抗葉酸塩抗新生物薬、L Y 2 3 1 5 1
 4 ペメトレキセド、メト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 - F U）等の抗代謝物、および U F T、S - 1 およびカベシタビン等のそのブ
 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（T O M U D E X[®] M、T D
 X）；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；ピサントレン；
 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；モピダンモル；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；P
 S K 7 ポリサッカリド錯体（J H S Natural Products, Eugene
 , O R）；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（E L D I S I N E（登録商標）、F I L D E S I N（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；ピボプロマン；ガシトシン；アラ
 ビノシド（“ A r a - 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、T A X O L（登録商標）パクリタキセル（B r i s t o l - M y e r s S
 q u i b b O n c o l o g y , P r i n c e t o n , N . J . ）、A B R A X A N E（
 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（A m
 e r i c a n P h a r m a c e u t i c a l P a r t n e r s , S c h a u m b e r
 g , I l l i n o i s ）、および T A X O T E R E（登録商標）ドセタキセル（R h o n
 e - P o u l e n c R o r e r , A n t o n y , F r a n c e ）、クロランブシル；ゲ
 ムシタピン（G E M Z A R（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；ビンブラスチン（VELBAN（登録商標））；エトボシド（VP-16；イフォスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；ビンカルカロイド；ビノレルビン（NAVELBINE（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；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロン酸塩；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；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CHOP（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FOLFOX（オキサリプラチン（ELOXATIN（商標））と5-FUおよびロイコポ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もある。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

30

【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、霊長類（ヒトおよび非ヒト霊長類を含む）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。

【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／または他の分子の実体を含む、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／または分子の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

【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もよい。

30

【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。

40

【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、Fab、Fab'、F(ab')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プへの結合が、過剰な非標識標的により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

30

【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。

40

【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 (1990)に記載される欠失変異

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、Semba 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。「erB2」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^{neu}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. USA 90:317-328 (2004)、および Plowman et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 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、欧州特許出願第599,274号、Plowman et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:1746-1750 (1993)、および Plowman

50

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)、neurotrophin (NDF) (Peles et al, Cell 69: 205 - 216 (1992))、アセチルコリン受容体誘導活性(ARIA) (Falls 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、Sliwkowski 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でき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、ラパチニブ/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Mab 2C4である。HER二量体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、Mab 806；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、Mab 579(ATCC CRL HB 8506)、Mab 455(ATCC CRL HB 8507)、Mab 225(ATCC CRL 8508)、Mab 528(ATCC CRL 8509)（米国特許第4,943,533号、Mendelson 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(WO98/50433、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- α 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、したがって免疫複合体を生成する(例えば、EP659, 439A2、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WO98/14451号、第WO98/50038号、第WO99/09016号、および第WO99/24037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.); ZD1839、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 (N8-3-クロロ-4-フルオロ-フェニル)-N2-(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); EKB-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) (Wyeth); AG1478 (Sugen); およびAG1571 (SU5271; Sug-en) 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、US5, 677, 171、US5, 720, 937、US5, 720, 954、US5, 725, 856、US5, 770, 195、US5, 772, 997、US6, 165, 464、US6,

10

20

30

40

50

3 8 7 , 3 7 1、US 6 , 3 9 9 , 0 6 3、US 2 0 0 2 / 1 9 2 2 1 I A 1、US 6
 , 0 1 5 , 5 6 7、US 6 , 3 3 3 , 1 6 9、US 4 , 9 6 8 , 6 0 3、US 5 , 8 2 1
 , 3 3 7、US 6 , 0 5 4 , 2 9 7、US 6 , 4 0 7 , 2 1 3、US 6 , 7 1 9 , 9 7 1
 、US 6 , 8 0 0 , 7 3 8、US 2 0 0 4 / 0 2 3 6 0 7 8 A 1、US 5 , 6 4 8 , 2 3
 7、US 6 , 2 6 7 , 9 5 8、US 6 , 6 8 5 , 9 4 0、US 6 , 8 2 1 , 5 1 5、WO
 9 8 / 1 7 7 9 7 , US 6 , 3 3 3 , 3 9 8 , US 6 , 7 9 7 , 8 1 4、US 6 , 3 3 9
 , 1 4 2、US 6 , 4 1 7 , 3 3 5、US 6 , 4 8 9 , 4 4 7、WO 9 9 / 3 1 1 4 0、
 US 2 0 0 3 / 0 1 4 7 8 8 4 A 1、US 2 0 0 3 / 0 1 7 0 2 3 4 A 1、US 2 0 0 5
 / 0 0 0 2 9 2 8 A 1、US 6 , 5 7 3 , 0 4 3、US 2 0 0 3 / 0 1 5 2 9 8 7 A 1、
 WO 9 9 / 4 8 5 2 7、US 2 0 0 2 / 0 1 4 1 9 9 3 A 1、WO 0 1 / 0 0 2 4 5、U 10
 S 2 0 0 3 / 0 0 8 6 9 2 4、US 2 0 0 4 / 0 0 1 3 6 6 7 A 1、WO 0 0 / 6 9 4 6
 0、WO 0 1 / 0 0 2 3 8、WO 0 1 / 1 5 7 3 0、US 6 , 6 2 7 , 1 9 6 B 1、US
 6 , 6 3 2 , 9 7 9 B 1、WO 0 1 / 0 0 2 4 4、US 2 0 0 2 / 0 0 9 0 6 6 2 A 1、
 WO 0 1 / 8 9 5 6 6、US 2 0 0 2 / 0 0 6 4 7 8 5、US 2 0 0 3 / 0 1 3 4 3 4 4
 、WO 0 4 / 2 4 8 6 6、US 2 0 0 4 / 0 0 8 2 0 4 7、US 2 0 0 3 / 0 1 7 5 8 4
 5 A 1、WO 0 3 / 0 8 7 1 3 1、US 2 0 0 3 / 0 2 2 8 6 6 3、WO 2 0 0 4 / 0 0
 8 0 9 9 A 2、US 2 0 0 4 / 0 1 0 6 1 6 1、WO 2 0 0 4 / 0 4 8 5 2 5、US 2 0
 0 4 / 0 2 5 8 6 8 5 A 1、US 5 , 9 8 5 , 5 5 3、US 5 , 7 4 7 , 2 6 1、US 4
 , 9 3 5 , 3 4 1、US 5 , 4 0 1 , 6 3 8、US 5 , 6 0 4 , 1 0 7、WO 8 7 / 0 7
 6 4 6、WO 8 9 / 1 0 4 1 2、WO 9 1 / 0 5 2 6 4、EP 4 1 2 , 1 1 6 B 1、EP 20
 4 9 4 , 1 3 5 B 1、US 5 , 8 2 4 , 3 1 1、EP 4 4 4 , 1 8 1 B 1、EP 1 , 0 0
 6 , 1 9 4 A 2、US 2 0 0 2 / 0 1 5 5 5 2 7 A 1、WO 9 1 / 0 2 0 6 2、US 5 ,
 5 7 1 , 8 9 4、US 5 , 9 3 9 , 5 3 1、EP 5 0 2 , 8 1 2 B 1、WO 9 3 / 0 3 7
 4 1、EP 5 5 4 , 4 4 1 B 1、EP 6 5 6 , 3 6 7 A 1、US 5 , 2 8 8 , 4 7 7
 、US 5 , 5 1 4 , 5 5 4、US 5 , 5 8 7 , 4 5 8、WO 9 3 / 1 2 2 2 0、WO 9 3
 / 1 6 1 8 5、US 5 , 8 7 7 , 3 0 5、WO 9 3 / 2 1 3 1 9、WO 9 3 / 2 1 2 3 2
 、US 5 , 8 5 6 , 0 8 9、WO 9 4 / 2 2 4 7 8、US 5 , 9 1 0 , 4 8 6、US 6 ,
 0 2 8 , 0 5 9、WO 9 6 / 0 7 3 2 1、US 5 , 8 0 4 , 3 9 6、US 5 , 8 4 6 , 7
 4 9、EP 7 1 1 , 5 6 5、WO 9 6 / 1 6 6 7 3、US 5 , 7 8 3 , 4 0 4、US 5
 , 9 7 7 , 3 2 2、US 6 , 5 1 2 , 0 9 7、WO 9 7 / 0 0 2 7 1、US 6 , 2 7 0 , 30
 7 6 5、US 6 , 3 9 5 , 2 7 2、US 5 , 8 3 7 , 2 4 3、WO 9 6 / 4 0 7 8 9、U
 S 5 , 7 8 3 , 1 8 6、US 6 , 4 5 8 , 3 5 6、WO 9 7 / 2 0 8 5 8、WO 9 7 / 3
 8 7 3 1、US 6 , 2 1 4 , 3 8 8、US 5 , 9 2 5 , 5 1 9、WO 9 8 / 0 2 4 6 3、
 US 5 , 9 2 2 , 8 4 5、WO 9 8 / 1 8 4 8 9、WO 9 8 / 3 3 9 1 4、US 5 , 9 9
 4 , 0 7 1、WO 9 8 / 4 5 4 7 9、US 6 , 3 5 8 , 6 8 2 B 1、US 2 0 0 3 / 0 0
 5 9 7 9 0、WO 9 9 / 5 5 3 6 7、WO 0 1 / 2 0 0 3 3、US 2 0 0 2 / 0 0 7 6 6
 9 5 A 1、WO 0 0 / 7 8 3 4 7、WO 0 1 / 0 9 1 8 7、WO 0 1 / 2 1 1 9 2、W
 O 0 1 / 3 2 1 5 5、WO 0 1 / 5 3 3 5 4、WO 0 1 / 5 6 6 0 4、WO 0 1 / 7 6 6
 3 0、WO 0 2 / 0 5 7 9 1、WO 0 2 / 1 1 6 7 7、US 6 , 5 8 2 , 9 1 9、US 2
 0 0 2 / 0 1 9 2 6 5 2 A 1、US 2 0 0 3 / 0 2 1 1 5 3 0 A 1、WO 0 2 / 4 4 4 1 40
 3、US 2 0 0 2 / 0 1 4 2 3 2 8、US 6 , 6 0 2 , 6 7 0 B 2、WO 0 2 / 4 5 6
 5 3、WO 0 2 / 0 5 5 1 0 6、US 2 0 0 3 / 0 1 5 2 5 7 2、US 2 0 0 3 / 0 1 6
 5 8 4 0、WO 0 2 / 0 8 7 6 1 9、WO 0 3 / 0 0 6 5 0 9、WO 0 3 / 0 1 2 0 7 2
 、WO 0 3 / 0 2 8 6 3 8、US 2 0 0 3 / 0 0 6 8 3 1 8、WO 0 3 / 0 4 1 7 3 6、
 EP 1 , 3 5 7 , 1 3 2、US 2 0 0 3 / 0 2 0 2 9 7 3、US 2 0 0 4 / 0 1 3 8 1 6
 0、US 5 , 7 0 5 , 1 5 7、US 6 , 1 2 3 , 9 3 9、EP 6 1 6 , 8 1 2 B 1、U
 S 2 0 0 3 / 0 1 0 3 9 7 3、US 2 0 0 3 / 0 1 0 8 5 4 5、US 6 , 4 0 3 , 6 3 0
 B 1、WO 0 0 / 6 1 1 4 5、WO 0 0 / 6 1 1 8 5、US 6 , 3 3 3 , 3 4 8 B 1
 、WO 0 1 / 0 5 4 2 5、WO 0 1 / 6 4 2 4 6、US 2 0 0 3 / 0 0 2 2 9 1 8、US
 2 0 0 2 / 0 0 5 1 7 8 5 A 1、US 6 , 7 6 7 , 5 4 1、WO 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 】

「HER 活性化」は、任意の 1 つ以上の HER 受容体の活性化またはリン酸化を指す。一般に、HER 活性化は、シグナル変換をもたらす（例えば、HER 受容体または基質ポリペプチド中の HER 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）。HER 活性化は、関心の HER 受容体を含む HER 二量体に結合する HER リガンドにより媒介され得る。HER 二量体に結合する HER リガンドは、二量体中の HER 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 HER 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 Akt または MAPK 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。

10

【 0 0 9 0 】

「ホスホリル化」は、1 つ以上のリン酸基（複数可）の HER 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 】

HER 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 EGFR、HER 3、または HER 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、HER 2 の細胞外ドメイン内の領域を指す。この領域は、HER 2 のドメイン II において見出される。Franklin et al. Cancer Cell 5 : 317 - 328 (2004)。

20

【 0 0 9 2 】

HER 2 の「ヘテロ二量体結合部位に結合する」HER 2 抗体は、ドメイン II 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 III 等の HER 2 細胞外ドメインの他のドメイン内の残基にも結合し）、HER 2 - EGFR、HER 2 - HER 3、または HER 2 - HER 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。Franklin et al. Cancer Cell 5 : 317 - 328 (2004) は、RCSB タンパク質データベースに預けられている (ID コード IS78) HER 2 - ペルツズマブ結晶構造を特徴付け、HER 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。HER 2 の「ドメイン II に結合する」抗体は、ドメイン II 内の残基、および任意選択により、ドメイン I および III 等の HER 2 の他のドメイン（複数可）内の残基に結合する。

30

【 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 15 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、SDS - PAGE 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。

40

【 0 0 9 4 】

「Erbb3 癌検出薬」は、ERBB3 核酸配列またはアミノ酸配列内の Erbb3 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、ERB

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】

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 M 6 0、G 6 9、M 9 1、V 1 0 4、Y 1 1 1、R 1 3 5、R 1 9 3、A 2 3 2、P 2 6 2、Q 2 8 1、G 2 8 4、V 2 9 5、Q 2 9 8、G 3 2 5、T 3 8 9、R 4 5 3、M 4 0 6、V 4 3 8、D 4 9 2、K 4 9 8、V 7 1 4、Q 8 0 9、S 8 4 6、E 9 2 8、S 1 0 4 6、R 1 0 8 9、T 1 1 6 4、および D 1 1 9 4 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、M 6 0 K、G 6 9 R、M 9 1 I、V 1 0 4 L、V 1 0 4 M、Y 1 1 1 C、R 1 3 5 L、R 1 9 3 *、A 2 3 2 V、P 2 6 2 S、P 2 6 2 H、Q 2 8 1 H、G 2 8 4 H、G 2 8 4 R、V 2 9 5 A、Q 2 9 8 *、G 3 2 5 R、T 3 8 9 K、M 4 0 6 K、V 4 3 8 I、R 4 5 3 H、D 4 9 2 H、K 4 9 8 I、V 7 1 4 M、Q 8 0 9 R、S 8 4 6 I、E 9 2 8 G、S 1 0 4 6 N、R 1 0 8 9 W、T 1 1 6 4 A、および D 1 1 9 4 E（* 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。

20

30

【0097】

E r b B 3 変異の特定

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 I I（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（E C D）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 / I I 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、V 1 0 4～L または M、A 2 3 2～V、および G 2 8 4～R を含む。他の一実施形態では、このクラスターは、M 6 0～K を含む。

40

【0098】

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

50

ンIIとIII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；体細胞変異特異的ヌ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）；変異特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションアッセイ（例えば、オリゴヌ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'ヌクレアーゼ分析（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、McClay 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'末端ヌクレオチドが、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

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カ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フオー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に特融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。

【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の方法は、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

10

20

30

40

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、Ahner and Jungbauer (2006) J. Chromatog. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 841: 110 - 122、およびWada (2002) J. Chromatog. B. 781: 291 - 301)を参照されたい。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できる。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、タンパク質分解に供された後、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。

10

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、タンパク質分解は、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せられる(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

50

照)。本明細書に開示される E r b B 3 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 (S N P) および連鎖不均衡である任意の追加の S N P 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 S N P と連鎖不均衡である任意の追加の S N P は、癌と関連付けられる。指定の S N P 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 S N P の発見は、この特定領域内の S N P の密度を増加させるために非常な関心であり得る。

【 0 1 1 6 】

追加の S N P 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 S N P と連鎖不均衡である追加の S N P の特定は、(a) 複数の個人からの第 1 の S N P 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 S N P を内包するか、または取り囲むゲノム領域内の第 2 の S N P を特定するステップと、(c) 該第 1 の S N P と該第 2 の S N P との間の連鎖不均衡分析を行うステップと、(d) 該第 2 の S N P 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 S N P 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。

【 0 1 1 7 】

E r b B 3 癌検出薬

一態様では、本発明は、E r b B 3 癌検出薬を提供する。一実施形態では、この検出薬は、図 3 9 に示される E r b B 3 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 3 9 (配列番号 3) に示される E R B B 3 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 3 9 に示される変異を含む E r b B 3 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) 。

【 0 1 1 8 】

別の態様では、E r b B 3 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、



であり、式中、

X は任意の核酸であり、a は約 0 ~ 約 2 5 0 (すなわち、5 ' 方向) であり、

Y は E r b B 3 変異コドンを表し、

Z は任意の核酸であり、b は約 0 ~ 約 2 5 0 (すなわち、3 ' 方向) である。

【 0 1 1 9 】

別の実施形態では、a または b は、約 2 5 0 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 2 5 0 であり、a または b は、約 0 ~ 約 2 4 5 、約 0 ~ 約 2 4 0 、約 0 ~ 約 2 3 0 、約 0 ~ 約 2 2 0 、約 0 ~ 約 2 1 0 、約 0 ~ 約 2 0 0 、約 0 ~ 約 1 9 0 、約 0 ~ 約 1 8 0 、約 0 ~ 約 1 7 0 、約 0 ~ 約 1 6 0 、約 0 ~ 約 1 5 0 、約 0 ~ 約 1 4 0 、約 0 ~ 約 1 3 0 、約 0 ~ 約 1 2 0 、約 0 ~ 約 1 1 0 、約 0 ~ 約 1 0 0 、約 0 ~ 約 9 0 、約 0 ~ 約 8 0 、約 0 ~ 約 7 0 、約 0 ~ 約 6 0 、約 0 ~ 約 5 0 、約 0 ~ 約 4 5 、約 0 ~ 約 4 0 、約 0 ~ 約 3 5 、約 0 ~ 約 3 0 、約 0 ~ 約 2 5 、約 0 ~ 約 2 0 、約 0 ~ 約 1 5 、約 0 ~ 約 1 0 、または約 0 ~ 約 5 である。

【 0 1 2 0 】

他の一実施形態では、a または b は、約 3 5 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 3 5 、約 0 ~ 約 3 4 、約 0 ~ 約 3 3 、約 0 ~ 約 3 2 、約 0 ~ 約 3 1

、約 0 ～ 約 3 0、約 0 ～ 約 2 9、約 0 ～ 約 2 8、約 0 ～ 約 2 7、

【 0 1 2 1 】

約 0 ～ 約 2 6、約 0 ～ 約 2 5、約 0 ～ 約 2 4、約 0 ～ 約 2 3、約 0 ～ 約 2 2、約 0 ～ 約 2 1、約 0 ～ 約 2 0、約 0 ～ 約 1 9、約 0 ～ 約 1 8、約 0 ～ 約 1 7、約 0 ～ 約 1 6、約 0 ～ 約 1 5、約 0 ～ 約 1 4、約 0 ～ 約 1 3、約 0 ～ 約 1 2、約 0 ～ 約 1 1、約 0 ～ 約 1 0、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。

【 0 1 2 2 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 6 0 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A A A および A A G 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 M 6 0 K 変異に対応する。

10

【 0 1 2 3 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 0 4 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A T G、C T T、C T C、C T A、C T G、T T A、および T T G 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 V 1 0 4 M または V 1 0 4 L 変異に対応する。

【 0 1 2 4 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 1 1 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、T G T および T G C 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 Y 1 1 1 C 変異に対応する。

20

【 0 1 2 5 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 3 5 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C T T、C T C、C T A、C T G、T T A、および T T G 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 R 1 3 5 L 変異に対応する。

【 0 1 2 6 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 9 3 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、T A A、T A G、および T G A 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 R 1 9 3 * (* は終止コドンである) 変異に対応する。

30

【 0 1 2 7 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 2 3 2 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、G T T、G T C、G T A、および G T G 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 A 2 3 2 V 変異に対応する。

【 0 1 2 8 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 2 6 2 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C A T、C A C、T C T、T C C、T C A、T C G、A G T、および A G C 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 P 2 6 2 H または P 2 6 2 S 変異に対応する。

40

【 0 1 2 9 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 2 8 4 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C G T、C G C、C G A、C G G、A G A、および A G G からなる群から選択される。これは、結腸癌または肺癌 (N S C L C 腺癌) と関連付けられる G 2 8 4 R 変異に対応する。

【 0 1 3 0 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 2 9 5 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、G C T、G C C、G C A、および G C G 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 V 2 9 5 A 変異に対応する。

50

【 0 1 3 1 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 3 2 5 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C G T、C G C、C G A、C G G、A G A、および A G G 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 G 3 2 5 R 変異に対応する。

【 0 1 3 2 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 4 0 6 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A C T、A C C、A G A、A C G、A A A および A A G 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 M 4 0 6 K または M 4 0 6 T 変異に対応する。

10

【 0 1 3 3 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 4 5 3 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C A T および C A C 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 R 4 5 3 H 変異に対応する。

【 0 1 3 4 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 4 9 8 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A T T、A T C、および A T A 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 K 4 9 8 I 変異に対応する。

【 0 1 3 5 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 8 0 9 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C G T、C G C、C G A、C G G、A G A、および A G G 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 Q 8 0 9 R 変異に対応する。

20

【 0 1 3 6 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 8 4 6 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A T T、A T C、および A T A 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 S 8 4 6 I 変異に対応する。

【 0 1 3 7 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 9 2 8 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、G G T、G G C、G G A、および G G G 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 E 9 2 8 G 変異に対応する。

30

【 0 1 3 8 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 0 8 9 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、T G G である。これは、胃癌と関連付けられる R 1 0 8 9 W 変異に対応する。

【 0 1 3 9 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 1 1 6 4 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、G C T、G C C、G C A、および G C G 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 T 1 1 6 4 A 変異に対応する。

40

【 0 1 4 0 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 4 9 2 位においてアミノ酸をコードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、C A T および C A C からなる群から選択される。これは、肺癌 (N S C L C 腺癌) と関連付けられる D 4 9 2 H 変異に対応する。

【 0 1 4 1 】

他の一実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号 2 の 7 1 4 位においてアミノ酸をコ

50

ードする E r b B 3 核酸配列にハイブリダイズし、Y は、A T G である。これは、肺癌 (N S C L C 腺癌) と関連付けられる V 7 1 4 M 変異に対応する。

【 0 1 4 2 】

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 つ以上の体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体細胞変異または変型は、E r b B 3 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 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、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の M 6 0、G 6 9、M 9 1、V 1 0 4、Y 1 1 1、R 1 3 5、R 1 9 3、A 2 3 2、P 2 6 2、Q 2 8 1、G 2 8 4、V 2 9 5、Q 2 9 8、G 3 2 5、T 3 8 9、R 4 5 3、M 4 0 6、V 4 3 8、D 4 9 2、K 4 9 8、V 7 1 4、Q 8 0 9、S 8 4 6、E 9 2 8、S 1 0 4 6、R 1 0 8 9、T 1 1 6 4、および D 1 1 9 4 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、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の M 6 0 K、G 6 9 R、M 9 1 I、V 1 0 4 L、V 1 0 4 M、Y 1 1 1 C、R 1 3 5 L、R 1 9 3 *、A 2 3 2 V、P 2 6 2 S、P 2 6 2 H、Q 2 8 1 H、G 2 8 4 H、G 2 8 4 R、V 2 9 5 A、Q 2 9 8 *、G 3 2 5 R、T 3 8 9 K、M 4 0 6 K、V 4 3 8 I、R 4 5 3 H、D 4 9 2 H、K 4 9 8 I、V 7 1 4 M、Q 8 0 9 R、S 8 4 6 I、E 9 2 8 G、S 1 0 4 6 N、R 1 0 8 9 W、T 1 1 6 4 A、および D 1 1 9 4 E (* 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 (N S C L C) 腺癌、N S C L C (扁平上皮癌)、腎癌、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、および膵臓癌からなる群から選択される、E r b B 3 癌の存在を示す。

10

20

【 0 1 4 3 】

他の一実施形態では、変化は、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の M 6 0、V 1 0 4、Y 1 1 1、R 1 5 3、R 1 9 3、A 2 3 2、P 2 6 2、V 2 9 5、G 3 2 5、M 4 0 6、R 4 5 3、D 4 9 2、K 4 9 8、V 7 1 4、Q 8 0 9、R 1 0 8 9、および T 1 1 6 4 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、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の M 6 0 K、V 1 0 4 M、V 1 0 4 L、Y 1 1 1 C、R 1 5 3 L、R 1 9 3 *、A 2 3 2 V、P 2 6 2 S、P 2 6 2 H、V 2 9 5 A、G 3 2 5 R、M 4 0 6 K、R 4 5 3 H、D 4 9 2 H、K 4 9 8 I、V 7 1 4 M、Q 8 0 9 R、R 1 0 8 9 W、および D 1 1 9 4 E (* 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 (N S C L C) 腺癌、N S C L C (扁平上皮癌)、腎癌、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、および膵臓癌からなる群から選択される、E r b B 3 癌の存在を示す。

30

【 0 1 4 4 】

他の一実施形態では、変化は、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の V 1 0 4、Y 1 1 1、R 1 5 3、A 2 3 2、P 2 6 2、G 2 8 4、T 3 8 9、R 4 5 3、K 4 9 8、および Q 8 0 9 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、E r b B 3 (配列番号 2) のアミノ酸配列中の V 1 0 4 L、V 1 0 4 M、Y 1 1 1 C、R 1 5 3 L、A 2 3 2 V、P 2 6 2 S、P 2 6 2 H、G 2 8 4 R、T 3 8 9 K、R 4 5 3 H、K 4 9 8 I、および Q 8 0 9 R のうちの少なくとも 1 つである。一実施形態では、E r b B 3 変異は、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。

40

【 0 1 4 5 】

一実施形態では、E r b B 3 置換は、M 6 0 に存在する。別の実施形態では、置換は、

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

、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。

【0161】

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。

【0162】

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。

【0163】

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

【0164】

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。

【0165】

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

【0166】

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、Re - 1 8 8、Re - 1 8 6、A t - 2 1 1、Cu - 6 7、Bi - 2 1 2、およびPd - 1 0 9が挙げられる。

【0167】

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

【0168】

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

【0169】

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。

【0170】

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。

【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。

【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。

【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。

【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

10

20

30

40

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、E r b B 3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E r b B 3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E r b B 3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、E r b B 3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E r b B 3中の体細胞変異の存在と関連させることを含む。

【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E r b B 3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】

なおもさらなる方法は、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E r b B 3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】

E r b B 3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E r b B 3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、E r b B 3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】

一実施形態では、亜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 E r b B 3 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、E r b B 3 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

【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、胸腔内および鼻腔内、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 1 k g 当たり約 1 0 n g ~ 最大 1 0 0 m g、好ましくは約 1 μ g / k g / 日 ~ 1 0 m g / k g / 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, 6 5 7, 7 6 0 号、第 5, 2 0 6, 3 4 4 号、または第 5, 2 2 5, 2 1 2 号を参照されたい。

30

【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、H E R 3 / E r b B 3 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 H E R 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、H E R 阻害剤は、H E R 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、E r b B 3 受容体に結合する。一実施形態では、H E R 抗体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、F u h らの W O 1 0 / 1 0 8 1 2 7 に記載されるもの等の H E R 3 および少なくとも 1 つの追加 H E R 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、H E R 阻害剤により治療される E r b B 3 癌は、H E R 3 を発現する細胞を含む。一実施形態では、H E R 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 (N S C L C) 腺癌、N S C L C (扁平上皮癌)、腎癌、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、および膵臓癌である。

40

50

【 0 1 9 5 】

本発明の別の態様は、個人における H E R 受容体の生体活性を阻害する方法を提供し、有効な量の H E R 阻害剤を個人に投与することを含む。一実施形態では、H E R 受容体は、個人における癌細胞により発現される H E R 3 受容体である。別の実施形態では、H E R 阻害剤は、少なくとも H E R 3 に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む H E R 抗体である。

【 0 1 9 6 】

本発明の一態様は、薬剤として使用するための H E R 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 H E R 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 H e r b B 3 / H E R 3 癌を治療することができる。一実施形態では、薬剤は、H E R 3 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、H E R 抗体は、H E R 3、または H E R 3 および少なくとも 1 つの追加の H E R 受容体に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む。

10

【 0 1 9 7 】

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 H E R 阻害剤を提供する。一実施形態では、H E R 阻害剤は、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 ; 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 ; 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 ; 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 ; M E H D 7 9 4 5 A - リガンド結合を遮断する (E G F R 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 / E G F R 抗体 ; ラパチニブ - 二重 E R B B 2 / E G F R 低分子阻害剤 ; および G D C - 0 9 4 1 4 8 - P I 3 K 阻害剤からなる群から選択される。

20

【 0 1 9 8 】

別の態様では、本発明は、対象における E r 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 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であって、この変異が、(本明細書に記載される) 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、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、(i i) 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

【 0 1 9 9 】

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

【 0 2 0 0 】

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 E r 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。

【 0 2 0 1 】

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、H E R 3 / E r b B 3 癌を有する個人を治療する方法を提供し、この治療方法は、複数の E r 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、E r b B

50

3 阻害剤、例えば、E r b B 3 拮抗薬、および少なくとも1つの追加のE r b B 阻害剤、例えば、E G F R、E r b B 2、またはE r b B 4 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、E r b B 3 拮抗薬およびE G F R 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、E r b B 3 拮抗薬およびE r b B 2 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、E r b B 3 拮抗薬およびE r b B 4 拮抗薬を投与することを含む。いくつかの実施形態では、E r b B 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、E r b B 拮抗薬のそれぞれは抗体である。

【0202】

キット

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E r b B 3 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、標的核酸配列の増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E r b B 3 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E r b B 3 消化管癌検出薬または1つ以上のE r b B 3 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、E r b B 3 阻害剤）を含む。

【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E r b B 3 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。

【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、ブロック緩衝剤、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。

【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、E r b B 3 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み、この変異は、（本明細書に記載される）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、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。

10

20

30

40

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に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 C F R 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、Q i a g e n T i s s u e 簡易キット(Q i a g e n , C A)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(A p p l i e d B i o s y s t e m s , C A)。P C R 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P C R 条件を使用して、3730x1 A B I 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、d b S N P データベースに存在しない変異体の存在について、M u t a t i o n S u r v e y o r (S o f t g e n e t i c s , P A) および追加の自動化配列整列プログラム

40

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（Sequenom, 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ーPCR および配列決定に使用されるプライマー

ERBB3 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)	配列決定ブ ライマー
1	DNA519201	TCCCTGCCATCC	CCCGACCTGACC	CGCGCGCTGACT	AATGCGCGCTCG	F & R
2	DNA519202	GGCCACTACGCTTC	TCCACAGTACAGCC	AGAAGAGAAAGCTCTC	TACAACAGTGAGCCATAG	F & R
3	DNA519203	GCGTAACCTGCTCA	GGCCCTCTATTGCTTAG	AGATCGCACTATTGACTC	TAGATCCCGCTACTG	F & R
4	DNA519204	CTCCTCATCTTATAAGGG	TGGTTAGATCCAGGAGA	CTGGACAGGTGACTGA	CTGCTCTTTTCTTGAACA	F & R
5	DNA519205	CGCCCTCTTGTGACA	CACTGAGGACACAGAT	CTGGTTGGGACTAG	GGCCAAAGCAGTGA	F & R
6	DNA519206	ATCAGAAGACTGCCAGA	TGTGGACAGCGAGGT	TTGCAAGGGCGCATG	AGCTGGAAGTTAGCTTG	F & R
7	DNA519207	CCAGTGCTGCCATGAT	GGAGGACTGGACGTA	TGTGCTCCTCAGTGTA	GGTGATAGCTGAAGTCAT	F & R
8	DNA519208	CAATAGTGAAGACTTTTGAAT	ATCTTGGTGCAGTTACAA	CTTACTTCTGCTCTTGA	AAGTCCAGGTTGCCC	F & R
9	DNA519209	CTGTCTCTCTGACAA	ATGGAGGATGTTTAAAGCA	GATCAACATCCTGTGTC	GATGTTCTGAGGGGA	F & R
10	DNA519210	CTTGTTCACAAAGATGCT	GACTGGATGTTCAAGTA	CCCTTAATTCTTGAGCTTG	ACACTGAAGTTGTGCTGT	F & R
11	DNA519211	TCACAGGTGAGTGGC	GATCCACTGAGAGGG	GTCTTCGGACAGTAC	GAATTTTCTCAGTGCTAGT	F & R
12	DNA519212	CCTCAAAACCAAGGGTTT	AGGACTCCAGCAAG	CACTGTCTCATACAGCA	GGAGAGGAGTCTGAG	F & R
13	DNA519213	AGGCTCTGCTAGGTG	CCAAGTCTGACCTTC	CAGAGCTCGGGTGA	TCCTGTAGTGGGA	F & R
14	DNA519214	CAGTCAAGGATGGGTG	TCCCAAGTCAATTCCATA	CTTTGAATGGTGACAGTA	GTCAAGAAATCAGATC	F & R
15	DNA519215	TGGACATCTGGGA	CACCCACCTCGGC	GATCTCCAAGGGAGAC	TCTCGAATCTCCGAC	F & R
16	DNA519216	TCAAGGGAGTTTACAGAA	CAGTCTAGACTACTGAAAG	GAACCTGGAATAACCTCA	GACCACTAAATCTGG	F & R
17	DNA517682	CTTTCACTAGTCTAAGACTG	ACCACACTACTTCTTGA	GCTTCTGGACTTCCC	CCAGTGTCTTCTAGGG	F & R
18	DNA517683	CAGGCTCTGTACCTC	TGCAGACTGGAATCTTGAT	GCACAAATACTTCTCAGTT	CCGTCCACTCTTGTC	F & R
19	DNA517684	GAAGCTTAAAGTGCTTGG	GAACCAACACAGTTTACA	CTTCAAGAGACAGAGCTAA	TAAGACACACAAAGGTTATCT	F & R
20	DNA517685	GGAGAGAGCAATATTAG	CGCTCACATGCTCTG	AAGGAATTCTGTATGCCG	CTTCACTCGCTTGCC	F & R
21	DNA517686	CCCAAAACCAACCCCTC	CCAGTCCCAAGTTCTTG	AAGGATCTAGTTGTGC	GCCTGAGCCACCG	F & R
22	DNA517687	AGCGGAGACTCCGT	CTGTCACTCTGTTGC	CACTGCACTCCAGTCT	CCGAAGGTCACTCACTC	F, R & R1
23	DNA517688	GATGCCCTCTCTACC	CAGCTCTGGTGACAA	CTGGAGCTATGGTCACT	CCAAGATTGATTGCACC	F, F1 & R
24	DNA517689	AGATGGGTTTCACTATGT	CTCTACTTCTCTAGCTT	AGATAGCTGGGACTTTAG	GTCTAGGTCTAGTTCTG	F & R
25	DNA519217	GCCCAACCTTTAAAGAAC	TGATGGACTTTAAAGGCTC	GTTGGATGATTGATGAGAAC	AAGATTACCTCGTTCATG	F & R
26	DNA519218	GCCTACCAAGTTGGAAC	CCTCAGGTGATCCA	CAACCCACACTGG	ATTACAGGTGTGCACCA	F & R
27a	DNA519219_1	GGCAGTGAACAACCCA	ATAACCTGTTGACATCCTC	GCACAAAGAACAGACT	GTGTGTATCTGGCATGA	F, R & R2
27b	DNA519219_2	CGTCCAGTCTCTCTACA	GAGGAGGGAGTACCT	TGGGAGCAGTGAACG	CAGAATGAGACCCAC	F & R
28a	DNA519220_1	CTCAAAGGTGCTGAC	CCCCTGAAAGCTCTC	CATGCCAGATACACACC	GGCGGCATATATGGA	F & R
28b	DNA519220_2	CTTGAGGAGCTGGGTT	GTCAAATGTTTAAAGCTCC	ATCCCCCTAGGCCAA	TACATACCATAGAATTTTGTGC	F & R

F1 = TCACCTGGCCCCAGTT; R1 = GCAGGAAGACATGGACT; R2 = CTCTTCTCTTAACCCG

表 1 は、「5 p 外側プライマー」配列を配列番号 3 ～ 3 2 として、「3 p 外側プライマー」配列を配列番号 3 3 ～ 6 2 として、「5 p 内側プライマー」配列を配列番号 6 3 ～ 9 2 として、「3 p 内側プライマー」配列を配列番号 9 3 ～ 1 2 2 として、「F1」、「R1」、および「R2」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。

10

20

30

40

【 0 2 1 4 】

細胞株

I L - 3 依存性マウス p r o - B 細胞株 B a F 3 および M C F 1 0 A、哺乳類上皮細胞

50

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】

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

10

20

【0216】

ウェスタンブロットの場合、pERBB3 (1289)、pEGFR (Y1068)、pRTBB2 (T1221/2)、pAKT (Ser473)、pMAPK、総 MAPK および AKT (Cell Signaling Technology, MA)、gD (Genentech Inc, CA)、 α -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】

安定した細胞株の生成

野生型または変異体 ERBB3 FLAG 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、Pheonix 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、ウェスタンブ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 ウイ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 ビ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。

30

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そ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 時間において、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 (Biotek 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 ウェルプレートに置き、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ブロット

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℃ で処置した。50 mM Tris-Cl 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、一晚 4℃ 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 Supersignal West Dura 化学発光検出基質(Thermo Fisher Scientific, IL)を使用して検出した。

【0220】

ウェスタンブロット研究の場合、MCF10A 細胞を血清飢餓させ、EGF または NRG1 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 培地中で一晚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、tif 画像ファイルを分析した。

【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 mL 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 °C で 2 週間インキュベートした。M C F 10 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 10 A 細胞は、D M E M : F 12 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 °C 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 10 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 30 , 256 - 268 (2003))。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 3D 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 , 359 - 365 (2007))。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 67 (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 647 (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 532 (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。40x 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 - 10 A 細胞、野生型 E R B B 3、または E R B 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 (C o r n i n g , # 3422) の上に播種した。無血清アッセイ培地中で 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デントの 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 ノ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 mg / kg Q W 抗ブタクサ (対照)、10 mg

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、骨髄、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髄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、および骨髄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。骨髄、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 (Tissue Tek, 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 (IACUC) 承認されたプロトコルの下で行った。

【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 (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、および**** $p < 0.0001$)。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。

【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膵臓癌、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

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（Jeonget 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. lupus（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	ゲノムスケレダルムスケレ オプド開始位オプド終了位 座*	ヌクレオチド 変化	AA CHGE	タンパク質ドメイン	COSMIC ID	試験 ID	疾患カテゴリー
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56477631	372T>A	60M>K	Recn_Lドメイン PF01030.15		96391	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56477654	503G>T	104V>L	Recn_Lドメイン PF01030.15		86336	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56477854	503G>A	104V>M	Recn_Lドメイン PF01030.15	20710	96445	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	ナンセンス	コ－ダイイング	12	+	56477854	503G>A	104V>M	Recn_Lドメイン PF01030.15	20710	95735	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481390	770C>T	193R>O	プリン様 PF00757.11		94200	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481660	888C>T	232A>V	プリン様 PF00757.11		96157	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481856	977C>T	262P>S	プリン様 PF00757.11		96157	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481857	977C>T	262P>H	プリン様 PF00757.11		101592	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481922	1043G>A	284G>R	プリン様 PF00757.11		96115	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481922	1043G>A	284G>R	プリン様 PF00757.11		94592	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56482336	1077T>C	295V>A	プリン様 PF00757.11		96737	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56482425	1166G>A	325G>R	プリン様 PF00757.11		96115	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56482425	1166G>A	325G>R	プリン様 PF00757.11		96115	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	同義	コ－ダイイング	12	+	56487150	1489C>T	432I>I	Recn_Lドメイン PF01030.15		98204	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56487228	1667G>C	492D>H	毒薬_7 PF05980.3		100695	非小細胞肺癌
2065	ERBB3	置換	同義	コ－ダイイング	12	+	56487675	1801G>A	536L>L			90574	肺腺癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56490371	2333G>A	714V>M	タンパク質キナーゼ_チロシン P00714.8		86582	非小細胞肺癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56490980	2619A>G	809Q>R	タンパク質キナーゼ_チロシン P00714.8		101592	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56491645	2730G>T	846S>I	タンパク質キナーゼ_チロシン P00714.8		101763	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56495133	3683A>G	1164T>A	タンパク質キナーゼ P00069.16		95504	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	同義	コ－ダイイング	12	+	56495713	4096G>A	1301Q>Q			96630	結腸直腸癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56477854	503G>A	104V>M			94120	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56477854	503G>A	104V>M			98988	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56478876	525A>G	111Y>C			94271	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56478948	597G>T	135R>L			94138	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56481660	888C>T	232A>V			94128	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56486603	1410T>C	406M>T			94117	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56487212	1551G>A	453R>H			94255	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56487560	1686A>T	498K>I			94137	胃癌
2065	ERBB3	置換	非同義	コ－ダイイング	12	+	56494908	3458C>T	1089R>W			92177	胃癌

*バージョンNCBI R37に基づくゲノム位置
WFS = 全エクソーム配列決定

10

20

30

40

表3ー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)	参考文献
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	腺芽細胞腫	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 / II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)、Petersenet 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) EGFまたはERBB2と共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されるとき、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

との組み合わせでの E R B B 3 変異体の発現は、E R B B 3 - W T 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、E R B B 3 変態の大部分は、E G F R または E R B B 2 との組み合わせで、p E R B B 3、p A K T、および p E R K の上昇につながる (図 11 B および C)。

【 0 2 3 3 】

M C F 1 0 A 細胞は、再構成された 3 次元 (3 D) 基底膜ゲル培地上で、E G F の存在下で培養されるとき、腺房細胞楕円体を形成する (M u t h u s w a m y e t a l . N a t C e l l B i o l 3 , 7 8 5 - 7 9 2 (2 0 0 1)、M u t h u s w a m y B r e a s t C a n c e r R e s e a r c h 1 3 , 1 0 3 (2 0 1 1))。しかしながら、いくつかの腫瘍遺伝子の発現は、それらを E G F 非依存性にし、複雑な多腺房構造ももたらす (D e b n a t h e t a l . T h e J o u r n a l o f c e l l b i o l o g y 1 6 3 , 3 1 5 - 3 2 6 (2 0 0 3)、B r u m m e r e t a l . J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y 2 8 1 , 6 2 6 - 6 3 7 (2 0 0 5)、B u n d y e t a l . M o l e c u l a r C a n c e r 4 , 4 3 (2 0 0 5))。血清、E G F、および N R G 1 を欠く 3 D 培養研究において、E R B B 3 変異体の異所的発現は、E G F R または M C F 1 0 A 細胞中の E G F R または E R B B 2 との組み合わせで、E R B B 3 - W T を E G F R または E R B B 2 と共発現する M C F 1 0 A 細胞と比較して、大きな腺房構造を促進した (図 12 A)。M C F 1 0 細胞を共発現する E R B B 3 変異体 / E R B B 2 に由来する腺房中の K i 6 7 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 12 B)。さらに、E R B B 3 変異体 / E R B B 2 のサブセットを発現する同一の M C F 1 0 A 細胞は、E R B B 3 - W T / E R B B 2 細胞と比較して、移行の増加も示した (図 12 C および図 13 A)。これらの結果を踏まえて、E R B B 3 変異体の腫瘍形成性質を確認する。

【 0 2 3 4 】

E R B B 3 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。

I M C E は、腫瘍形成 R a s 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 ' A b a c o e t a l . (1 9 9 6)、M o l C e l l B i o l 1 6 , 8 8 4 - 8 9 1、W h i t e h e a d e t a l . (1 9 9 3)、P N A S 9 0 , 5 8 7 - 5 9 1)。I M C E 細胞を使用して、E R B B 3 変異体を、E R B B 3 変異体を単独で、または E R B B 2 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 13 B (a ~ b) に示されるように、E R B B 3 - W T 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、E R B B 3 変異体の大部分は、E R B B 3 - W T とは異なり、E R B B 2 と共発現されるとき、アンカレッジ非依存性増殖を促進した (図 13 B (a ~ b))。観測されるアンカレッジ非依存性増殖と一致して、E R B B 2 と一緒に E R B B 3 変異体を発現する I M C E 細胞の大部分は、p E R B B 3 および / または p E R B B 2 の上昇、ならびに p A K T および / または p E R K の同時増加を示した (図 13 B (c ~ d))。E R B B 3 変異体の一部は、それ自体が E R B B 3 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。E R B B 3 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 E C D 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、E R B B 3 V 1 0 4 M、P 2 6 2 H、または G 2 8 4 R を共発現する I M C E 細胞は、W T とは k となり、E R B B 2 と一緒に腫瘍増殖を促進する (図 13 B (e))。

【 0 2 3 5 】

E R B B 3 変異体は、I L 3 非依存性細胞生存および形質転換を促進する。

E R B B 3 変異の腫瘍形成の関連をさらに確認するために、E R B B 3 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 E G F R もしくは E R B B 2 との組み合わせでのいずれかで、I

L-3 依存性 B a F 3 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。B a F 3 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 (I L) - 3 依存性 p r o - B 細胞株である (L e e e t a l . (2 0 0 6) . P L o S m e d i c i n e 3 , e 4 8 5 、 W a r m u t h e t a l . (2 0 0 7) C u r r e n t o p i n i o n i n o n c o l o g y 1 9 , 5 5 - 6 0) 。 E R B B 3 変異体は、単独で発現されたとき、B a F 3 細胞の I L - 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、E G F R - W T または E R B B 2 - W T との組み合わせで共発現されたとき、W T - E R B B 3 よりもはるかに有効であった (図 1 4 および図 1 5 A 、 B) 。 E R B B 2 と共発現された E R B B 3 変異体は、約 1 0 ~ 5 0 倍以上、I L - 3 非依存性生存を促進することにおいて、E G F R と共発現されたときよりはるかに有効であった (図 1 4) 。これは、活性化後に形成される E R B B 3 - E R B B 2 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 (P i n k a s - K r a m a r s k i e t a l . T h e E M B O j o u r n a l 1 5 , 2 4 5 2 - 2 4 6 7 (1 9 9 6) 、 T z a h a r e t a l . M o l e c u l a r a n d c e l l u l a r b i o l o g y 1 6 , 5 2 7 6 - 5 2 8 7 (1 9 9 6) 、 H o l b r o e t a l . P N A S 1 0 0 , 8 9 3 3 - 8 9 3 8 (2 0 0 3)) 。興味深いことに、Q 8 0 9 R キナーゼドメイン変異体は、E R B B 2 または E G F R との組み合わせで、B a F 3 細胞の I L - 3 非依存性生存を促進することにおいて、検査した E C D 変異体のどれよりも有効であった。観測される I L - 3 非依存性細胞生存活性と一致して、E R B B 3 変異体の大部分は、単独で、または E R B B 2 また E G F R との組み合わせで発現されるとき、リン酸化の増加、活性 E R B B 受容体の署名を示した (図 1 5 A ~ C) 。さらに、E R B B 2 と共発現した E R B B 3 変異体は、E R B B 3 - W T と比較して、p - E R B B 2 (Y 1 2 2 1 / 2) の上昇を示した (図 1 5 C) 。また E G F R または E R B B 2 との組み合わせで、E R B B 3 変異の大部分は、E R B B 3 変異体による構成的下流シグナル伝達と一致して、p - A K T および p - E R K レベルの上昇を示した (図 1 5 B 、 C) 。E R B B 3 変異体が B a F 3 細胞の I L 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。P 2 6 2 H 、 G 2 8 4 R 、および Q 8 0 9 R E R B B 3 変異体を、E R B B 2 との組み合わせで安定的に発現する B a F 3 細胞は、E R B B 3 - W T 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 1 6) 。変異体のいくつかは、E G F R 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、E R B B 2 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、E R B B 2 媒介性腫瘍形成シグナル伝達における E R B B 3 の要件を確立する、以前の報告と一致する (H o l b r o e t a l . P N A S 1 0 0 , 8 9 3 3 - 8 9 3 8 (2 0 0 3) 、 L e e - H o e f l i c h e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 6 8 , 5 8 7 8 - 5 8 8 7 (2 0 0 8)) 。

【 0 2 3 6 】

B a F 3 システムを使用して、6 つの E C D 多発点変異体および 4 つの E R B B 3 キナーゼドメイン変異体 (V 7 1 4 M 、 Q 8 0 9 R 、 S 8 4 6 I 、および E 9 2 8 G) を含む、いくつかの E R B B 3 E C D 変異体 (V 1 0 4 M 、 A 2 3 2 V 、 P 2 6 2 H 、 P 2 6 2 S 、 G 2 8 4 R 、および T 3 8 9 K) を、I L - 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、E R B B 3 変異体を単独で、または E R B B 2 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。E R B B 3 は、キナーゼ不全であり、リガンド結合に続いて、E R B B 2 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 (H o l b r o e t a l . (2 0 0 3) 上記、K a r u n a g a r a n e t a l . (1 9 9 6) . T h e E M B O j o u r n a l 1 5 , 2 5 4 - 2 6 4 ; L e e - H o e f l i c h e t a l . (2 0 0 8) 上記、S l i w k o w s k i e t a l . (1 9 9 4) 上記) 。これと一致して、外因性リガンドの不在下で、E R B B 3 野生型 (W T) および E R B B 3 変異体は、それ自体が B a F 3 細胞の I L - 3 非依存性生存を促進しなかった (図 3 7 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 3 7 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 3 7 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 3 7 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 3 7 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 3 7 B ~ B）。B a F 3 細胞のウェスタンブロット分析は、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 3 7 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 の上昇を示さなかったが（図 3 7 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った（図 3 7 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 3 7 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（H e g d e e t a l . M a n u s c r i p t s u b m i t t e d (2 0 1 1) 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った（図 1 7）。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 ヘ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 1 8）。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（S o d e r b e r g e t a l . N a t M e t h o d s 3 , 9 9 5 - 1 0 0 0 (2 0 0 6)）（図 1 9 および図 2 0 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 2 0 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

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 2 1)。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 2 1)。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 2 1)。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 1 8)。これらの結果は、全

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 e t a l . (2 0 1 1) 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 3 7 G)。図 3 7 H 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 o r n e t a l . O n c o g e n e 2 7 , 4 0 9 6 - 4 1 0 6 (2 0 0 8)、J a i s w a l e t a l . C a n c e r C e l l 1 6 , 4 6 3 - 4 7 4 (2 0 0 9))。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対照として使用した。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、2 2 ~ 2 7 日の平均生存を示したことが分かった (図 2 2)。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、6 0 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 (3 9 日、図 2 2)。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ったが、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りガンド依存性シグナル伝達に部分的に起因する (J u n t t i l a e t a l . C a n c e r C e l l 1 5 , 4 2 9 - 4 4 0 (2 0 0 9))。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、2 0 日目に剖検を行った。これらの動物からの骨髓、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、単離した骨髓および脾臓を、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髓および脾臓は、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髓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 2 3 ~ 2 6)。さらに、観測された長い潜伏期間と一致して、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 2 5 A および図 2 7) および肝臓 (図 2 5 B および図 2 7) 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 2 6) 。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))、ベルツズマブ - 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 (E G F R 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 / E G F R 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 (E G F R のドメイン I I I に結合する) E G F R 抗体 (Li, S. et al. Cancer Cell 7, 301 - 311 (2005))、ラパチニブ (Medina, P. J. & Goodin, S. Clin Ther 30, 1426 - 1447 (2008)) - 二重 E R B B 2 / E G F R 低分子阻害剤および G D C - 0941 (Edgar, K. A. et al. Cancer Research 70, 1164 - 1172 (2010)) - P I 3 K 阻害剤を、BaF3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 2 8、図 2 9、および図 3 0) 。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 3 1) 。増殖およびコロニー形成アッセイの両方において、Q809R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パチニブ、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 2 8 および 2 9) 。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 2 8 および 2 9) 。しかしながら、ベルツズマブ、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、Q809R 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 2 8 および 2 9) 。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 BaF3 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 3 2 および図 3 3) 。

【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、G284R および Q8

10

20

30

40

50

09R ERBB3変異体に対して、BAF3系を生体内で使用して検査した(図31、34、および35)。生体外で観測されるように、トラスツマブは、G284RまたはQ809R ERBB3/ERBB2を発現するBAF3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31A)。同様に、抗ERBB3・1および抗ERBB3・2は、G284R ERBB3-ECDOおよびERBB2を共発現するBAF3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31A)。しかしながら、これらの抗ERBB3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、Q809R ERBB3/ERBB2を発現するBAF3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31B)。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ERBB3変異体を発現する浸潤BAF3細胞の著しい減少を発見した(図34および図36)。観測されるBAF3細胞の浸潤の低下と一致して、脾臓および肝臓重量は、BALB/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35および図25)。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、ERBB3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

【0244】

この研究では、結腸癌および胃癌における頻繁なERBB3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

【0245】

これらの生体外および生体内機能研究は、ECDOおよびキナーゼドメインERBB3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、ECDO変異体の一部、V104M、P262H、Q284R、およびT389Kが、ERBB3リガンドNRG1の不在下で腫瘍形成性であるが、NRG1の付加によりさらに刺激されることを示す。ECDO変異は、WTに対して非繫留確認に対して繫留されたERBB3 ECDと非繫留ERBB3 ECDとの間の均衡を移行させ得る。

【0246】

いくつかの治療薬を、ERBB3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ERBB2および抗ERBB3 ECD抗体は、検査したERBB3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、ペルツマブ、抗ERBB3・1およびGDC-0941は、キナーゼドメイン変異体Q809R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、ペルツマブがリガンド媒介性ERBB3/ERBB2二量体化を遮断することにおいて非常に有効であるが、トラスツマブは、リガンド非依存性ERBB2/ERBB3二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ERBB3変異体Q809Rは、ペルツマブと比較して、トラスツマブによる阻害に対してはるかに応答性が高く、Q809R ERBB3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。PI3K阻害剤GDC-0941は、検査したERBB3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Q809Rを遮断することにおけるその低い有用性は、PI3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

40

【0247】

shRNA媒介性ERBB3ノックダウンは、生体内増殖に影響を及ぼす。

IMCE細胞におけるERBB3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ERBB3の影響を検査しようとした。近年の研究は、CW-2、結腸細胞株、およびDV90、肺株が、それぞれERBB3 E928GおよびV104M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ERBB3を標的

50

とするドキシサイクリン (dox) 誘導性 shRNA を発現する、安定した CW - 2 および DV90 細胞株を生成した (Garnett et al. (2012) Nature 483, 570 - 575)。配列決定を標的とする dox 誘導性ルシフェラーゼ (luc) を発現した対照株も生成した。dox 誘導時に、luc shRNA 発現株とは対照的に、ERBB3 および pERK のレベルは、ERBB3 shRNA を発現した細胞において減少した (図 38A ~ B)。dox 誘導後の ERBB3 の喪失と一致して、DV90 および CW - 2 はいずれも、ルシフェラーゼ shRNA 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 38C ~ F)。次に、DV90 および CW - 2 細胞中の ERBB3 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。shRNA を標的とする ERBB3 の dox 媒介性誘導時に、DV90 および CW - 2 細胞はいずれも、luc - shRNA を発現したか、または ERBB3 shRNA を発現するように誘導されない DV90 または CW - 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 38G ~ J)。これらのデータを一緒に考慮して、腫瘍発生における ERBB3 変異の役割をさらに確認する。

10

【図 1 A】

試料 ID	Site 名	マッピングした 正常試験 H	疾患カテゴリー	組織サブカテ ゴリー	組織診断	全エクソーム 配列決定 (WES)
86336	HF-1327	87323	結核菌感染		肺癌	
94592	HF-17829(42)	94591	結核菌感染		肺癌	
95504	HF-18430(41)	95508	結核菌感染		肺癌	
95735	HF-18040(41)	95739	結核菌感染		肺癌	
96115	HF-18138(41)	96119	結核菌感染		肺癌	21.1
96157	HF-18152(41)	96161	結核菌感染		肺癌	21.1
96391	HF-18172(41)	96395	結核菌感染		肺癌	21.1
96445	HF-18190(41)	96449	結核菌感染		肺癌	21.1
96562	HF-18454(41)	96566	結核菌感染		肺癌	
96757	HF-18500(41)	96761	結核菌感染		肺癌	21.1
101763	HF-17364(41)	101767	結核菌感染		肺癌	21.1
94200	HF-17545(41)	94204	結核菌感染		肺癌	
101593	HF-20325(41)	101597	結核菌感染		肺癌	
86582	HF-15220(41)	86927	結核菌感染	結核菌感染	肺癌	
100695	HF-19917(41)	100699	結核菌感染	結核菌感染	肺癌	
86337	HF-1480	87322	結核菌感染		肺癌	
86337	HF-1480	87322	結核菌感染		肺癌	
86337	HF-1480	87322	結核菌感染		肺癌	
86341	HF-2468	87326	結核菌感染		肺癌	
86342	HF-2525	87327	結核菌感染		肺癌	
86343	HF-3446	87328	結核菌感染		肺癌	
86345	HF-3602	87330	結核菌感染		肺癌	
95147	HF-17896(41)	95146	結核菌感染		肺癌	21.1
95163	HF-17930(41)	95164	結核菌感染		肺癌	21.1
95356	HF-18263(41)	95354	結核菌感染		肺癌	
95362	HF-18277(41)	95360	結核菌感染		肺癌	21.1
95374	HF-18285(41)	95372	結核菌感染		肺癌	21.1
95498	HF-18428(41)	95502	結核菌感染		肺癌	
95669	HF-18026(41)	95673	結核菌感染		肺癌	21.1
95681	HF-18030(41)	95685	結核菌感染		肺癌	21.1
95687	HF-18032(41)	95691	結核菌感染		肺癌	21.1
95699	HF-18036(41)	95703	結核菌感染		肺癌	21.1
95729	HF-17998(41)	95733	結核菌感染		肺癌	21.1
95856	HF-18092(41)	95900	結核菌感染		肺癌	21.1
96121	HF-18140(41)	96125	結核菌感染		肺癌	21.1
96139	HF-18146(41)	96143	結核菌感染		肺癌	21.1
96145	HF-18148(41)	96149	結核菌感染		肺癌	21.1
96205	HF-18158(41)	96209	結核菌感染		肺癌	
96496	HF-18198(41)	96500	結核菌感染		肺癌	21.1
96610	HF-18470(41)	96614	結核菌感染		肺癌	21.1
96654	HF-18478(41)	96658	結核菌感染		肺癌	21.1
96689	HF-18418(41)	96693	結核菌感染		肺癌	21.1

【図 1 B】

96689	HF-18418(41)	96693	結核菌感染		肺癌	21.1
96719	HF-18494(41)	96723	結核菌感染		肺癌	21.1
96725	HF-18496(41)	96729	結核菌感染		肺癌	21.1
96767	HF-18512(41)	96771	結核菌感染		肺癌	21.1
96876	HF-18550(41)	96880	結核菌感染		肺癌	21.1
96951	HF-18572(41)	96955	結核菌感染		肺癌	21.1
97041	HF-18596(41)	97045	結核菌感染		肺癌	21.1
97059	HF-18602(41)	97063	結核菌感染		肺癌	21.1
97075	HF-18604(41)	97079	結核菌感染		肺癌	21.1
97103	HF-18612(41)	97107	結核菌感染		肺癌	21.1
97458	HF-18701(41)	97456	結核菌感染		肺癌	21.1
97509	HF-17958(41)	97507	結核菌感染		肺癌	21.1
97673	HF-18318(41)	97670	結核菌感染		肺癌	21.1
97938	HF-18315(41)	97936	結核菌感染		肺癌	21.1
97944	HF-18359(41)	97942	結核菌感染		肺癌	
97950	HF-18361(41)	97948	結核菌感染		肺癌	
98491	HF-18824(41)	98489	結核菌感染		肺癌	21.1
101775	HF-18267(41)	101773	結核菌感染		肺癌	21.1
101787	HF-18381(41)	101785	結核菌感染		肺癌	21.1
101886	HF-20391(41)	101884	結核菌感染		肺癌	21.1
86339	HF-2400	87324	結核菌感染		肺癌	
86340	HF-2408	87325	結核菌感染		肺癌	
95149	HF-17903(41)	95148	結核菌感染		肺癌	
95221	HF-17942(41)	95219	結核菌感染		肺癌	
95462	HF-18339(41)	95460	結核菌感染		肺癌	
95593	HF-18006(41)	95599	結核菌感染		肺癌	
95705	HF-18038(41)	95709	結核菌感染		肺癌	21.1
95717	HF-17994(41)	95721	結核菌感染		肺癌	21.1
95753	HF-18046(41)	95757	結核菌感染		肺癌	21.1
95887	HF-18074(41)	95891	結核菌感染		肺癌	21.1
95909	HF-18078(41)	95913	結核菌感染		肺癌	
96056	HF-18118(41)	96060	結核菌感染		肺癌	
96241	HF-18170(41)	96245	結核菌感染		肺癌	21.1
96409	HF-18178(41)	96413	結核菌感染		肺癌	
96502	HF-18434(41)	96506	結核菌感染		肺癌	21.1
96514	HF-18436(41)	96518	結核菌感染		肺癌	
96618	HF-18466(41)	96622	結核菌感染		肺癌	21.1
96624	HF-18468(41)	96628	結核菌感染		肺癌	21.1
96672	HF-18468(41)	96676	結核菌感染		肺癌	21.1
96791	HF-18520(41)	96795	結核菌感染		肺癌	21.1
96810	HF-18558(41)	96814	結核菌感染		肺癌	
96828	HF-18554(41)	96832	結核菌感染		肺癌	21.1
96894	HF-18556(41)	96898	結核菌感染		肺癌	21.1
96918	HF-18564(41)	96922	結核菌感染		肺癌	21.1
96945	HF-18570(41)	96949	結核菌感染		肺癌	21.1
96963	HF-18576(41)	96967	結核菌感染		肺癌	
96969	HF-18578(41)	96973	結核菌感染		肺癌	21.1
97065	HF-18594(41)	97069	結核菌感染		肺癌	21.1

【図 1 C】

97067	HF-18598-(1)	97051	樹脂	樹脂	樹脂
97053	HF-18605-(1)	97057	樹脂	樹脂	樹脂
97058	HF-18609-(1)	97064	樹脂	樹脂	樹脂
97052	HF-18595-(1)	97060	樹脂	樹脂	樹脂
97058	HF-18592-(1)	97066	樹脂	樹脂	樹脂
97083	HF-18253-(1)	98059	樹脂	樹脂	樹脂
98107	HF-18323-(1)	98103	樹脂	樹脂	樹脂
98123	HF-18327-(1)	98119	樹脂	樹脂	樹脂
98473	HF-18818-(1)	98471	樹脂	樹脂	樹脂
101904	HF-20397-(1)	101902	樹脂	樹脂	樹脂
101910	HF-20399-(1)	101908	樹脂	樹脂	樹脂
101922	HF-20403-(1)	101920	樹脂	樹脂	樹脂
101988	HF-20385-(1)	101986	樹脂	樹脂	樹脂
101883	HF-20411-(1)	101881	樹脂	樹脂	樹脂
88034	HF-50824-(1)	88023	樹脂	樹脂	樹脂
88026	HF-50809-(1)	88025	樹脂	樹脂	樹脂
88028	HF-80206-(1)	88027	樹脂	樹脂	樹脂
88173	HF-92294-(1)	88172	樹脂	樹脂	樹脂
88175	HF-16285-(1)	88174	樹脂	樹脂	樹脂
94018	HF-64674-(1)	94017	樹脂	樹脂	樹脂
94020	HF-69664-(1)	94019	樹脂	樹脂	樹脂
94021	HF-70484-(1)	94022	樹脂	樹脂	樹脂
94024	HF-70634-(1)	94023	樹脂	樹脂	樹脂
94023	HF-71232-(1)	94026	樹脂	樹脂	樹脂
94046	HF-18367-(1)	94040	樹脂	樹脂	樹脂
99091	HF-19089-(1)	99091	樹脂	樹脂	樹脂
100663	HF-19439-(1)	100667	樹脂	樹脂	樹脂
101450	HF-20081-(1)	101448	樹脂	樹脂	樹脂
101474	HF-20333-(1)	101472	樹脂	樹脂	樹脂
92180	HF-17152-(1)	92188	樹脂	樹脂	樹脂
94203	HF-17546-(1)	94191	樹脂	樹脂	樹脂
94383	HF-17286-(1)	94386	樹脂	樹脂	樹脂
94420	HF-17579-(1)	94419	樹脂	樹脂	樹脂
94433	HF-17609-(1)	94431	樹脂	樹脂	樹脂
94472	HF-17566-(1)	94471	樹脂	樹脂	樹脂
94433	HF-18840-(1)	94431	樹脂	樹脂	樹脂
94439	HF-18842-(1)	94437	樹脂	樹脂	樹脂
98982	HF-19113-(1)	98980	樹脂	樹脂	樹脂
101574	HF-20319-(1)	101572	樹脂	樹脂	樹脂
101598	HF-20527-(1)	101596	樹脂	樹脂	樹脂
92175	HF-17145-(1)	92184	樹脂	樹脂	樹脂
92192	HF-17240-(1)	92193	樹脂	樹脂	樹脂
94218	HF-17551-(1)	94196	樹脂	樹脂	樹脂
94237	HF-17554-(1)	94199	樹脂	樹脂	樹脂
94253	HF-17159-(1)	94266	樹脂	樹脂	樹脂
94263	HF-17188-(1)	94266	樹脂	樹脂	樹脂
94367	HF-17189-(1)	94310	樹脂	樹脂	樹脂
94315	HF-17197-(1)	94318	樹脂	樹脂	樹脂

【図 1 D】

97698	HF-18864-(1)	97694	樹脂	樹脂	樹脂
97708	HF-18868-(1)	97706	樹脂	樹脂	樹脂
97714	HF-18850-(1)	97712	樹脂	樹脂	樹脂
98284	HF-17945-(1)	98288	樹脂	樹脂	樹脂
98246	HF-18379-(1)	98246	樹脂	樹脂	樹脂
98409	HF-18453-(1)	98407	樹脂	樹脂	樹脂
98427	HF-18838-(1)	98425	樹脂	樹脂	樹脂
98964	HF-19107-(1)	98962	樹脂	樹脂	樹脂
99935	HF-19354-(1)	99939	樹脂	樹脂	樹脂
100003	HF-20021-(1)	100001	樹脂	樹脂	樹脂
100543	HF-19437-(1)	100547	樹脂	樹脂	樹脂
100549	HF-19437-(1)	100553	樹脂	樹脂	樹脂
91925	HF-17225-(1)	91928	樹脂	樹脂	樹脂
88187	HF-56443	88188	樹脂	樹脂	樹脂
88170	HF-56920	88169	樹脂	樹脂	樹脂
89942	HF-17078-(1)	89910	樹脂	樹脂	樹脂
91913	HF-17079-(1)	91916	樹脂	樹脂	樹脂
91919	HF-17224-(1)	91922	樹脂	樹脂	樹脂
91931	HF-17229-(1)	91934	樹脂	樹脂	樹脂
91937	HF-17268-(1)	91940	樹脂	樹脂	樹脂
98747	HF-17493-(1)	98746	樹脂	樹脂	樹脂
98751	HF-17499-(1)	98750	樹脂	樹脂	樹脂
98755	HF-17592-(1)	98754	樹脂	樹脂	樹脂
85795	HF-15545-(1)	87794	樹脂	樹脂	樹脂
88122	HF-16884	88121	樹脂	樹脂	樹脂
88124	HF-16884	88123	樹脂	樹脂	樹脂
88126	HF-16890	88125	樹脂	樹脂	樹脂
88128	HF-16892	88127	樹脂	樹脂	樹脂
91780	HF-16922-(1)	91779	樹脂	樹脂	樹脂
91816	HF-17086-(1)	91815	樹脂	樹脂	樹脂
91818	HF-17087-(1)	91817	樹脂	樹脂	樹脂
91820	HF-17088-(1)	91819	樹脂	樹脂	樹脂
91822	HF-17089-(1)	91844	樹脂	樹脂	樹脂
91824	HF-17090-(1)	91823	樹脂	樹脂	樹脂
95281	HF-18230-(1)	95286	樹脂	樹脂	樹脂
95288	HF-18233-(1)	95291	樹脂	樹脂	樹脂
97775	HF-18686-(1)	97779	樹脂	樹脂	樹脂
97781	HF-18689-(1)	97783	樹脂	樹脂	樹脂
97803	HF-18719-(1)	97809	樹脂	樹脂	樹脂
97856	HF-18787-(1)	97848	樹脂	樹脂	樹脂
97884	HF-18789-(1)	97852	樹脂	樹脂	樹脂
97868	HF-18790-(1)	97854	樹脂	樹脂	樹脂
97854	HF-18882-(1)	97888	樹脂	樹脂	樹脂
97869	HF-18884-(1)	97894	樹脂	樹脂	樹脂
97895	HF-18886-(1)	97900	樹脂	樹脂	樹脂
99878	HF-19071-(1)	99887	樹脂	樹脂	樹脂
101594	HF-20337-(1)	101592	樹脂	樹脂	樹脂
101516	HF-20341-(1)	101514	樹脂	樹脂	樹脂

【図 1 E】

88130	HF-16884	88129	樹脂	樹脂	樹脂
88131	HF-16873	88132	樹脂	樹脂	樹脂
91812	HF-17684-(1)	91811	樹脂	樹脂	樹脂
91826	HF-17691-(1)	91825	樹脂	樹脂	樹脂
95305	HF-18385-(1)	108057	樹脂	樹脂	樹脂
97793	HF-18713-(1)	97797	樹脂	樹脂	樹脂
97844	HF-18782-(1)	97842	樹脂	樹脂	樹脂
97860	HF-18785-(1)	97850	樹脂	樹脂	樹脂
99125	HF-19069-(1)	99123	樹脂	樹脂	樹脂
99552	HF-19692-(1)	99555	樹脂	樹脂	樹脂
99871	HF-19008-(1)	99875	樹脂	樹脂	樹脂
101486	HF-20013-(1)	101484	樹脂	樹脂	樹脂
101498	HF-20335-(1)	101496	樹脂	樹脂	樹脂
86318	HF-11765	87234	樹脂	樹脂	樹脂
86327	HF-11754	87229	樹脂	樹脂	樹脂
86501	HF-11751	87221	樹脂	樹脂	樹脂
86503	HF-11734	87223	樹脂	樹脂	樹脂
86506	HF-11743	87226	樹脂	樹脂	樹脂
86507	HF-11744	87694	樹脂	樹脂	樹脂
86507	HF-11744	87694	樹脂	樹脂	樹脂
86507	HF-11744	87694	樹脂	樹脂	樹脂
86564	HF-48104-(1)	86858	樹脂	樹脂	樹脂
86570	HF-37111-(1)	86855	樹脂	樹脂	樹脂
86578	HF-80225	87228	樹脂	樹脂	樹脂
86583	HF-15224-(1)	86928	樹脂	樹脂	樹脂
86548	HF-15355-(1)	87236	樹脂	樹脂	樹脂
86551	HF-11757-(2)	87695	樹脂	樹脂	樹脂
86570	HF-15217	86925	樹脂	樹脂	樹脂
86575	HF-15515-(1)	87405	樹脂	樹脂	樹脂
86583	HF-15533-(1)	87415	樹脂	樹脂	樹脂
86586	HF-15539-(1)	87418	樹脂	樹脂	樹脂
86589	HF-15567-(1)	87428	樹脂	樹脂	樹脂
86590	HF-15570-(1)	87429	樹脂	樹脂	樹脂
86592	HF-15505-(1)	87430	樹脂	樹脂	樹脂
86596	HF-15546-(1)	87421	樹脂	樹脂	樹脂
86590	HF-15546-(1)	87421	樹脂	樹脂	樹脂
86595	HF-15546-(1)	87421	樹脂	樹脂	樹脂
86598	HF-15549-(1)	87423	樹脂	樹脂	樹脂

【図 1 F】

86516	HF-11756	87230	樹脂	樹脂	樹脂
86519	HF-11756	87696	樹脂	樹脂	樹脂
86520	HF-11770	86842	樹脂	樹脂	樹脂
86521	HF-11772	86844	樹脂	樹脂	樹脂
86522	HF-11776	86846	樹脂	樹脂	樹脂
86524	HF-11782	86848	樹脂	樹脂	樹脂
86525	HF-11751	87227	樹脂	樹脂	樹脂
86526	HF-11752	87228	樹脂	樹脂	樹脂
86528	HF-11756	87231	樹脂	樹脂	樹脂
86529	HF-11763	87233	樹脂	樹脂	樹脂
86530	HF-11767	87235	樹脂	樹脂	樹脂
86531	HF-11771	86843	樹脂	樹脂	樹脂
86532	HF-11780	86847	樹脂	樹脂	樹脂
86533	HF-11783	86849	樹脂	樹脂	樹脂
86534	HF-11785	86850	樹脂	樹脂	樹脂
86582	HF-11732	87222	樹脂	樹脂	樹脂
86584	HF-11737	87224	樹脂	樹脂	樹脂
86585	HF-11739	87225	樹脂	樹脂	樹脂
86563	HF-3043-(1)	86852	樹脂	樹脂	樹脂
86565	HF-5158-(1)	86859	樹脂	樹脂	樹脂
86566	HF-8890-(1)	86862	樹脂	樹脂	樹脂
86567	HF-3030-(1)	86864	樹脂	樹脂	樹脂
86568	HF-3703-(1)	86853	樹脂	樹脂	樹脂
86569	HF-3705-(1)	86854	樹脂	樹脂	樹脂
86571	HF-3718-(1)	86856	樹脂	樹脂	樹脂
86572	HF-4527-(1)	86857	樹脂	樹脂	樹脂
86576	HF-5171	86860	樹脂	樹脂	樹脂
86579	HF-15212-(1)	86922	樹脂	樹脂	樹脂
86580	HF-15215-(1)	86924	樹脂	樹脂	樹脂
86581	HF-15218-(1)	86926	樹脂	樹脂	樹脂
86584	HF-15227-(1)	86929	樹脂	樹脂	樹脂
86586	HF-15231-(1)	86932	樹脂	樹脂	樹脂
86587	HF-15233-(1)	86933	樹脂	樹脂	樹脂
86590	HF-15237-(1)	86934	樹脂	樹脂	樹脂

【図 1 G】

86591	HF-15240-(1)	86935	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86752	HF-11769-(2)	87697	非半導体部品	絶縁部	
86753	HF-11775-(2)	86845	非半導体部品	絶縁部	
86769	HF-15213	86923	非半導体部品	絶縁部	
86771	HF-15228	86950	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86772	HF-15506-(1)	87402	非半導体部品	絶縁部	
86773	HF-15514-(1)	87403	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86774	HF-15512-(1)	87404	非半導体部品	絶縁部	
86776	HF-15516-(1)	87406	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86782	HF-15527-(1)	87414	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86784	HF-15534-(1)	87416	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86785	HF-15535-(1)	87417	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86791	HF-15541-(1)	87419	非半導体部品	絶縁部	
86794	HF-15523-(1)	87411	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86797	HF-15547-(1)	87422	非半導体部品	絶縁部	
86799	HF-15558-(1)	87424	非半導体部品	絶縁部	
86800	HF-15559-(1)	87425	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86801	HF-15560-(1)	87426	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86802	HF-15561-(1)	87427	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86803	HF-15564-(1)	87705	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86835	HF-15576-(1)	87838	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86839	HF-15594-(1)	87699	非半導体部品	絶縁部	
86726	HF-15521-(1)	87409	非半導体部品	絶縁部	
86779	HF-15522-(1)	87410	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
94671	HF-15894-(1)	106531	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
94699	HF-15901-(1)	106533	非半導体部品	絶縁部	
94755	HF-15928-(1)	106537	非半導体部品	大面積部	
98019	HF-15878-(1)	106529	非半導体部品	絶縁部	
98850	HF-18620-(1)	98854	非半導体部品	大面積部	
98856	HF-18632-(1)	98900	非半導体部品	大面積部	
100615	HF-19424-(1)	100619	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100627	HF-19441-(1)	100631	非半導体部品	絶縁部	
100641	HF-19967-(1)	100639	非半導体部品	絶縁部	
101043	HF-20009-(1)	101041	非半導体部品	大面積部	

【図 1 H】

101213	HF-20118-(1)	101217	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
101286	HF-20122-(1)	101290	非半導体部品	絶縁部	
101339	HF-20146-(1)	101363	非半導体部品	絶縁部	
101384	HF-20174-(1)	101388	非半導体部品	絶縁部	
101668	HF-20305-(1)	101666	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
103091	HF-20302-(1)	103095	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86322	HF-11779	105597	非半導体部品	絶縁部	
86573	HF-2130	86851	非半導体部品	絶縁部	
86585	HF-15230-(1)	86931	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86588	HF-15234-(1)	87699	非半導体部品	絶縁部	
86749	HF-15358-(1)	87237	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86777	HF-15520-(1)	87408	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86789	HF-15525-(1)	87412	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86781	HF-15526-(1)	87413	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86787	HF-15540-(1)	87703	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
86788	HF-15542-(1)	87420	非半導体部品	絶縁部	
86793	HF-15519-(1)	87407	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
87867	HF-15503-(1)	87968	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
87969	HF-15487-(1)	87970	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
87973	HF-15479-(1)	87972	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
88177	HF-16076-(1)	88176	非半導体部品	大面積部	
89960	HF-15476-(1)	89958	非半導体部品	絶縁部	
94675	HF-15893-(1)	106532	非半導体部品	大面積部	
94759	HF-15854-(1)	106541	非半導体部品	大面積部	
98004	HF-15912-(1)	106535	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
98007	HF-15913-(1)	106536	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
98010	HF-15859-(1)	106528	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
98681	HF-18664-(1)	98685	非半導体部品	大面積部	
98850	HF-18407-(1)	98848	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
98884	HF-18628-(1)	98888	非半導体部品	大面積部	
99237	HF-18639-(1)	99233	非半導体部品	大面積部	
99283	HF-18643-(1)	99281	非半導体部品	大面積部	
99319	HF-18655-(1)	99311	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100635	HF-19913-(1)	100633	非半導体部品	絶縁部	

【図 1 I】

100683	HF-19911-(1)	100681	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100701	HF-19919-(1)	100699	非半導体部品	絶縁部	
100739	HF-19931-(1)	100737	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100751	HF-19935-(1)	100749	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100783	HF-19943-(1)	100781	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100789	HF-19947-(1)	100787	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100831	HF-19951-(1)	100829	非半導体部品	絶縁部	
100837	HF-19955-(1)	100835	非半導体部品	大面積部	
100849	HF-19959-(1)	100847	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100867	HF-19963-(1)	100865	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100879	HF-19973-(1)	100877	非半導体部品	絶縁部	
100918	HF-19977-(1)	100916	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
100960	HF-19991-(1)	100958	非半導体部品	絶縁部	
101007	HF-19995-(1)	101005	非半導体部品	大面積部	
101037	HF-20007-(1)	101035	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
101119	HF-19997-(1)	101117	非半導体部品	絶縁部	
101125	HF-20005-(1)	101123	非半導体部品	絶縁部	
101189	HF-20130-(1)	101192	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
101201	HF-20134-(1)	101205	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
101225	HF-20142-(1)	101229	非半導体部品	絶縁部	
101317	HF-20152-(1)	101321	非半導体部品	大面積部	
101335	HF-20158-(1)	101339	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
101704	HF-20317-(1)	101702	非半導体部品	絶縁部	
101714	HF-20348-(1)	101718	非半導体部品	絶縁部	
102004	HF-16447-(1)	102008	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
103044	HF-20520-(1)	103048	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
103082	HF-20516-(1)	103086	非半導体部品	大面積部	
103591	HF-20701-(1)	103590	非半導体部品	絶縁部	
103599	HF-20705-(1)	103598	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
103603	HF-20707-(1)	103602	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
103645	HF-20697-(1)	103643	非半導体部品	絶縁部	
103651	HF-20699-(1)	103649	非半導体部品	偏平上皮部絶縁部	
92963	HF-13068-(1)	92966	非半導体部品	大面積部	
92919	HF-14159-(1)	92918	非半導体部品	大面積部	
92924	HF-16277-(1)	92922	非半導体部品	大面積部	

【図 1 J】

98164	HF-18393-(1)	98162	非半導体部品	絶縁部	
98598	HF-18770-(1)	98596	非半導体部品	絶縁部	
88013	HF-16897-(1)	88014	非半導体部品	絶縁部	
88015	HF-16899-(1)	88019	非半導体部品	絶縁部	
88016	HF-16901-(1)	88020	非半導体部品	絶縁部	
88017	HF-16902-(1)	88021	非半導体部品	絶縁部	
88018	HF-16903-(1)	88022	非半導体部品	絶縁部	
90528	HF-17525-(1)	90527	非半導体部品	絶縁部	
90540	HF-17528-(1)	90539	非半導体部品	絶縁部	
90552	HF-17531-(1)	90551	非半導体部品	絶縁部	
90554	HF-17532-(1)	90571	非半導体部品	絶縁部	
92121	HF-16154-(1)	92120	非半導体部品	絶縁部	
92125	HF-16280-(1)	92123	非半導体部品	絶縁部	
92439	HF-17778-(1)	92440	非半導体部品	絶縁部	
92441	HF-17780-(1)	92442	非半導体部品	絶縁部	
92445	HF-17786-(1)	92446	非半導体部品	絶縁部	
92447	HF-17788-(1)	92448	非半導体部品	絶縁部	
98170	HF-18395-(1)	98168	非半導体部品	絶縁部	
98188	HF-18481-(1)	98184	非半導体部品	絶縁部	
98200	HF-18483-(1)	98198	非半導体部品	絶縁部	
98561	HF-17782-(1)	98564	非半導体部品	絶縁部	
98586	HF-18389-(1)	98584	非半導体部品	絶縁部	
98610	HF-18774-(1)	98608	非半導体部品	絶縁部	
99024	HF-19073-(1)	99022	非半導体部品	絶縁部	
99048	HF-19081-(1)	99046	非半導体部品	絶縁部	
99054	HF-19083-(1)	99052	非半導体部品	絶縁部	
100799	HF-19119-(1)	100803	非半導体部品	絶縁部	
100811	HF-19128-(1)	100815	非半導体部品	絶縁部	
100817	HF-19130-(1)	100821	非半導体部品	絶縁部	
88181	HF-16363-(1)	90270	非半導体部品	絶縁部	
87862	HF-3687-(1)	87861	非半導体部品	絶縁部	
100434	HF-19435-(1)	100438	非半導体部品	絶縁部	
100494	HF-20041-(1)	100492	非半導体部品	絶縁部	
86367	HF-2179-(1)	90236	非半導体部品	絶縁部	
86368	HF-3058-(1)	90237	非半導体部品	絶縁部	
86369	HF-3453-(1)	90238	非半導体部品	絶縁部	
87869	HF-3681-(1)	87859	非半導体部品	絶縁部	
87864	HF-3278-(1)	87863	非半導体部品	絶縁部	
87870	HF-3997-(1)	87869	非半導体部品	絶縁部	
87876	HF-9227-(1)	87875	非半導体部品	絶縁部	
87977	HF-4038-(1)	87978	非半導体部品	絶縁部	
87979	HF-4036-(1)	87980	非半導体部品	絶縁部	
87987	HF-9479-(1)	87990	非半導体部品	絶縁部	
89943	HF-8979-(2)	87877	非半導体部品	絶縁部	
89944	HF-8985-(1)	87873	非半導体部品	絶縁部	
90142	HF-8645-(1)	90139	非半導体部品	絶縁部	
90160	HF-7018-(1)	90157	非半導体部品	絶縁部	
90212	HF-8998-(2)	90210	非半導体部品	絶縁部	

【 図 1 L 】

100388	HF-19301-(1)	100392	符建强	符建强
100394	HF-19303-(3)	100398	符建强	符建强
100400	HF-19305-(1)	100404	符建强	符建强
100412	HF-19311-(1)	100416	符建强	符建强
100428	HF-19317-(1)	100432	符建强	符建强
100446	HF-20025-(3)	100450	符建强	符建强
100452	HF-20027-(1)	100456	符建强	符建强
100458	HF-20029-(1)	100460	符建强	符建强
100503	HF-20069-(4)	100507	符建强	符建强
100509	HF-20071-(4)	100513	符建强	符建强
100575	HF-20073-(4)	100579	符建强	符建强
100581	HF-20075-(4)	100585	符建强	符建强
100587	HF-20077-(4)	100589	符建强	符建强
100593	HF-20079-(4)	100597	符建强	符建强
102061	HF-20053-(1)	102065	符建强	符建强
102095	HF-20051-(2)	102099	符建强	符建强
102321	HF-20426-(1)	102325	符建强	符建强
102333	HF-20430-(1)	102337	符建强	符建强
102396	HF-20438-(1)	102400	符建强	符建强
102402	HF-20441-(1)	102406	符建强	符建强
102408	HF-20444-(1)	102412	符建强	符建强
102743	HF-20465-(1)	102747	符建强	符建强
102749	HF-20466-(1)	102753	符建强	符建强
102773	HF-20490-(1)	102777	符建强	符建强
102785	HF-20494-(1)	102789	符建强	符建强
102828	HF-20472-(1)	102832	符建强	符建强
102834	HF-20486-(1)	102838	符建强	符建强
85457	HF-9739	87805	李国柱	李国柱
96687	HF-18666-(1)	96691	李国柱	李国柱
204418	HF-8740	87804	李国柱	李国柱
96711	HF-18694-(1)	96715	李国柱	李国柱
96717	HF-18686-(1)	96721	李国柱	李国柱
96735	HF-18702-(1)	96739	李国柱	李国柱
96741	HF-18704-(1)	96745	李国柱	李国柱
96759	HF-17693-(1)	96758	李国柱	李国柱
101626	HF-20291-(1)	101624	李国柱	李国柱
101640	HF-20297-(1)	101642	李国柱	李国柱
101650	HF-20299-(1)	101648	李国柱	李国柱
103639	HF-20605-(1)	103637	李国柱	李国柱
94128	HF-17075-(1)	94130	符建	符建
94117	HF-17111-(1)	94123	符建	符建
94120	HF-17106-(1)	94126	符建	符建
94137	HF-17120-(1)	94145	符建	符建
94118	HF-17123-(1)	94146	符建	符建
92177	HF-17149-(1)	92185	符建	符建
94255	HF-17156-(1)	94258	符建	符建
94271	HF-17161-(1)	94274	符建	符建
96988	HF-19151-(1)	96990	符建	符建

94073	HF-17064(-I)	94082	竹筴	鮫皮
94074	HF-17065(-I)	94083	竹筴	鮫皮
94327	HF-17186(-I)	94330	竹筴	鮫皮
94331	HF-17100(-I)	94334	竹筴	長鰭鮫
94291	HF-17202(-I)	94294	竹筴	鮫皮
94347	HF-17226(-I)	94350	竹筴	鮫皮
94175	HF-17106(-I)	94178	竹筴	鮫皮
93174	HF-17104(-I)	93182	竹筴	長鰭鮫
92176	HF-17147(-I)	93183	竹筴	長鰭鮫
94287	HF-17154(-I)	94250	竹筴	鮫皮
94259	HF-17158(-I)	94262	竹筴	鮫皮
94209	HF-17548(-I)	94193	竹筴	鮫皮
94444	HF-17581(-I)	958609	竹筴	鮫皮
94416	HF-17573(-I)	94415	竹筴	鮫皮
94440	HF-17554(-I)	94439	竹筴	鮫皮
94408	HF-17485(-I)	958608	竹筴	鮫皮
98216	HF-17975(-I)	98220	竹筴	鮫皮
98260	HF-18281(-I)	98254	竹筴	鮫皮
98234	HF-18369(-I)	98222	竹筴	鮫皮
98230	HF-18371(-I)	98228	竹筴	鮫皮
98236	HF-18373(-I)	98234	竹筴	長鰭鮫
98242	HF-18375(-I)	98240	竹筴	鮫皮
98421	HF-18836(-I)	98419	竹筴	鮫皮
97726	HF-18854(-I)	97724	竹筴	長鰭鮫
99947	HF-19360(-I)	99951	竹筴	鮫皮
100025	HF-19366(-I)	100029	竹筴	鮫皮
100031	HF-19368(-I)	100035	竹筴	鮫皮
100055	HF-19376(-I)	100059	竹筴	鮫皮
99905	HF-19336(-I)	99907	竹筴	鮫皮
99919	HF-19346(-I)	99913	竹筴	鮫皮
99977	HF-19352(-I)	99981	竹筴	鮫皮
99955	HF-19305(-I)	99953	竹筴	鮫皮
100063	HF-19378(-I)	100065	竹筴	鮫皮
100085	HF-19386(-I)	100089	竹筴	鮫皮
100091	HF-19385(-I)	100095	竹筴	鮫皮
100097	HF-19390(-I)	100101	竹筴	鮫皮
99997	HF-20019(-I)	99995	竹筴	鮫皮
100121	HF-19398(-I)	100125	竹筴	長鰭鮫
100127	HF-19400(-I)	100131	竹筴	鮫皮
100519	HF-19404(-I)	100523	竹筴	長鰭鮫
100531	HF-19408(-I)	100535	竹筴	長鰭鮫
115584	HF-81234(-I)	115583	竹筴	鮫皮
94445	HF-17581(-I)	958609	竹筴	鮫皮
94441	HF-17574(-I)	94439	竹筴	鮫皮
94166	HF-17193(-I)	竹筴	鮫皮	鮫皮
94174	HF-17110(-I)	竹筴	鮫皮	鮫皮
94464	HF-17568(-I)	竹筴	鮫皮	鮫皮
99000	HF-19119(-I)	竹筴	鮫皮	鮫皮

【 図 2 A 】

700525	HF 190509-41)		管		管	
115562	HF 7112-43)		乳盖		乳盖	
587244	HF 18094-42)	587245	洁厕刷(脚踏)		乳盖	乳盖
587682	HF 18265-41)	587283	洁厕刷(脚踏)	S 产品	脚踏	乳盖
587286	HF 18275-41)	587287	洁厕刷		乳盖	乳盖
587288	HF 18280-41)	587289	洁厕刷		乳盖	乳盖
587338	HF 20387-41)	587380	洁厕刷(脚踏)	S 产品	乳盖	乳盖
587390	HF 20389-42)	587394	洁厕刷		脚踏	乳盖

1	actcagccatg	cgcgcgggag	ctggccgcgcgc	cgtacacacc	ccccctcccc	ctgctgtctt
61	cccctcccct	ctctctctct	ctgcacacac	ccaccccccc	ccccctgcatc	ctctcccgga
121	ctctgcgctc	cgctccgcat	gcaattcttcg	actccctgcg	ccctccgcgc	agccacgcgc
181	aattctgcagc	cggcttcagct	cgctctctgc	tcgattgtct	agctcagggg	ccccccggcc
241	ggactctgtc	cgctccctct	ccccctctgc	ggatccatgc	ggggcagaca	cgtctctgag
301	ctgctctgag	ctctctgctg	ctctctctgc	ctctctctgc	ccccctctgc	ccccctctgc
361	tgtctctgga	ctctctgagc	ctctgagtgc	accgcggctg	ctggcaacca	ataccagaca
421	ctgtcacacc	ctctcagagc	ctgtgaggct	gtgtggggga	actcttgatg	tgtctctgac
481	ggacacaaag	cgcagctctc	ctctctgcgc	tgatctggag	aagtgcagaa	ctatctctct
541	gtgtgcctac	atgaattctc	tactcttaca	tgtccaccc	ccccctggctg	gcgaaggagc
601	cagctctcag	atgggaagct	ttgcattctc	ctgcatctga	ctctctctgc	ccactctcag
661	ctgtctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
721	atgtgagaga	acgtataact	tgtctcactc	gacacattct	actctggagc	ctatctgtag
781	gacgcgagc	ctctgagtgc	gtgtgaagac	aattgcagaa	ctgtctcccc	ctgtctgag
841	gtttcagaag	ctctcagctg	gggtctctgc	ctagaagact	ggccacagct	gaccaaaccc
901	atctctgctg	cgcagtgtac	gtgtcaactg	cttggccaca	cccccaacca	gtctgtgcac
961	gatctgtgct	ctctcagctc	ctccagcactc	gacgcctgac	accctctctg	ctgtctggac
1021	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
1081	actctctcag	tgggaaccca	ctcccaacca	aaatctaatg	atggaggagc	ctgtctgtag
1141	agctctcccc	ataaactttg	gttggttaca	acatctctgc	ctcagggctgc	ctctcttcag
1201	aagatgagaa	tagataaata	tggcttcaag	atgtctgagc	ctgtggggg	actatgtccc
1261	aaagctctg	agggagacac	ctctggggac	cgctcccgac	ctcttgagtc	gagcaacctc
1321	tgatgatgtc	tgaaactcac	caaatctctc	ggccaccctg	actctctctg	ccagcagctc
1381	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
1441	acactgagag	agatcacac	ttacctgac	atccagctc	ggccctccca	catgcacac
1501	tgtctgtgtt	ttctcaattc	gacaaacctc	gaggagacac	cgctctctca	cgagggtctc
1561	tcattgtgtc	ctatgaagaa	ctctgaatgc	acatctctgc	ctctctcagc	cttgaagctc
1621	atctctgctg	ggcgtctata	tataagcttc	ataatgcgc	ctctgcacac	caactctttg
1681	aaatcagaca	agtgctctgc	ggggctctgc	gaaagcgagc	tgatcacaca	gcatatctgc
1741	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
1801	tgtctggccc	agccctctgc	ctcatgtctg	ctctctgaaa	attatagctg	aggaagtgtc
1861	tgtctctacc	actgcacact	ctctcatatg	gagctctcag	aatttcgca	tgaagctcaa
1921	tgctctctgc	gcacacccga	ctgcacacc	atagaaggca	ctgcacatc	gactctgctc
1981	ggctctctata	ctgtctctga	atgtcgacct	cttcgagctc	ggcccacatc	tgtagcagac
2041	tgccccctct	cagctctctg	cttcggccctc	ccaatctaca	agccacagaa	tgcttcgaat
2101	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
2161	tggtttgagc	aaacacgtgc	gctgatctgc	aaacacctc	tgcaatagct	tttgcagctc
2221	atagacagat	tggttgatct	tttatctctc	ctctggcgca	ctctctctca	ctggcgctgg
2281	cgcgcctctc	agatataaaa	ggctatggag	cgatctctgc	accggggctg	gagcatcagc
2341	ctctctgacc	cagctgagaa	ggctacaaa	ctgtctggca	gactcttaca	agagacagac
2401	ctaaagagac	ctaaagctgc	tgctgtctgc	ctgtcttgaa	ctatgcacaa	agagatctgc
2461	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
2521	gagctctgag	ttctctcaag	tgctcagatc	catatgctc	ctctgggac	ctctgacctc
2581	gcccacctct	taagctgtct	gggactatgc	ccaggtctgc	actctgcagc	tgctcacatc
2641	tatttgcctc	tggtctctct	ctctgatcat	gtgacacac	accctgggac	actctggcca
2701	cagctctgcg	ctcaactggg	agtacaaact	gccaagggaa	tgatcaactc	tgaggaacac
2761	ggatctgtgc	ataaaccact	ctgtccgcga	acagctctac	ctatgcacac	caatgcaggtc
2821	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
2881	agacacagc	agctctctgc	ggctctggat	ggctctgaga	ctatctacct	tgggaaacct
2941	acacacagca	gtactctctg	gagctctgc	tgtagctctt	ggaggtgtgc	gactcttcgg
3001	cgagacgctc	atgcagacct	acgatctgct	gaagtacac	actctgtaga	gaaggttgag
3061	cgctgtgacc	agccccagat	ctgtcaaatc	gtgtcttaca	tggtgtgagc	caatctgttg
3121	atctctgtag	agaaactctc	ccccctctgc	aaagactatc	ccaatgagct	ccccctgagc
3181	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
3241	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc	ctctctctgc
3301	ctatgactac	actctgactc	ggaaagcagc	gaggaacac	ctggccacac	caacactggc
3361	ctcgtccctca	ctgctaccag	tggaaacctc	atactgcacc	ctgtggagcga	gcgtcttttc

【図 2 B】

```

3421 agtccatcat ctggatacat gcccatgaac cagggttaac ttggggagtc ttgccaggag
3481 tctgcagttt ctggggagcag tgaacgggtgc ccccggtccag tctctctaca cccaatgccaa
3541 cggggatgcc ttggcatcaga gtcatcagag ggcgatgtaa caggctctga ggcctgagctc
3601 cagggaagag ttgcaacttg taagagagctg agcagagagcc ggagcccccag gccacgcgga
3661 gatagccctt accatttcca gggccacagc ctgctgaact ctgttaccoc actctcccaca
3721 cccgggttag aggaagaaga gtccaacgtgt tatgtcatgc cagatataca cctcaaaagt
3781 actccctccr cccgggaagg caccctctct toagtgggtc tcaagtctctg cctgggttact
3841 gaagaagaag atgaagatga ggagtatgaa tacatgaacc ggaggagaag gccacgtcca
3901 cctcatcccc ctaggccaag ttcccttgag gagctgggtt atgagtacat ggaatgggg
3961 tcagacctca gtgctctctt gggcagccca cagagttgcc cactccacc cgtaccatc
4021 atgcaccact caggcacaac tccagatgaa gactatgaat atatgaatcg gcaacagat
4081 ggaagtggtc ctgggggtga ttatgcagcc atgggggctt gccacgcatc tgaacagagg
4141 tatgaagaga tgaagcttt tcaagggctt ggcacatcag ccccccactg ccttatggc
4201 cgcctaaaaa ctttaagtag ctttagggct acagactctg cctttgataa ccttgattac
4261 tggcatacga ggcctttccc caagctaat gccacagaa cgtactcctt gctccctgtg
4321 gcactcagg agctttaaat ggcactagt gcccttagag ggtactctct toctccattt
4381 cctctctctt cccaggtccc agcccccttt cccagtcctc agacaattcc attcaattt
4441 tggaggtctt taacattttt gacacaaaat tcttatggta tgtagccagg tgtgcaattt
4501 cttctctttt ccaaccccag gaaaggtttt ccttattttg tgtgcttttc cagtccattt
4561 cctcagcttc ttccacaggga cctctggaga tatgaaggat tactctccat atcccttctt
4621 ctcaggtctc tgacactctt gaactaggct cttatgtgtg cctttgtctt ccatcagact
4681 gtcaagaaga ggaagggagg gaaacctagc agagagaagt tgaatttttg tttatgactc
4741 ttaacccctt agaaagagag aagcttaaaa tctgtgaaga aagaggttag gaggatagat
4801 tgattactat cataattcac cacttaacta tgaagcaggc atcatactaa acttcaacta
4861 cattactcca cttagctctt tatcatctct aaaaacaatt tgtgacatac atattatctc
4921 attttacaca aaggggaagt gggcatgggt gctcatgctt gtaatctcag cactttggga
4981 ggttgaggga gaaagattac ctgagccaag gagtttgaga ccagcttagc caacatagta
5041 agaccccat cttcttseaa aaaaaaaaaa aaaaactttg aactgggtgc
5101 agtggctcat gccctgaatc ccagccagca ctttgggagg ctgagatggg aagatcactt
5161 gagcccccaga ggcctatgga acatagcaag acatgtcttc tacaggggaa
5221 aaaaaaaag gctatggag tgaataaat taaagagag taacagatg
5281 caaaatctct ccaattctg tgcattgtct cttattgtaa ggtgccaaga aaaaactgatt
5341 taagttacag ccttgttlla aggggcactg tttctgttt ttgcactgaa tcaagcttaa
5401 ccccaacagc caactctctc tatacctaga catctcatct cagggaatgg ttgtgggggt
5461 agtcacagag aaaaaataact ggacatcttt gtgttaaaacca taatccacat gtgcccgtaaa
5521 tgaatttcac tctttatccg agggcaaat cacaaggatc cccaagctcc acttttagaa
5581 gccatttcca tccagcagtg agaaagcttc aggtaggaca gaaaaaagat ccagcttcag
5641 ctgcacacct ctgtcccccctt ggaaggggga ctaaggggaa acgtctgtgt tatcaactgaa
5701 tttttttgtt ttgtttttat acgtgtctga ataataatgc caaagttttt tttagcaca
5761 aaaaa

```

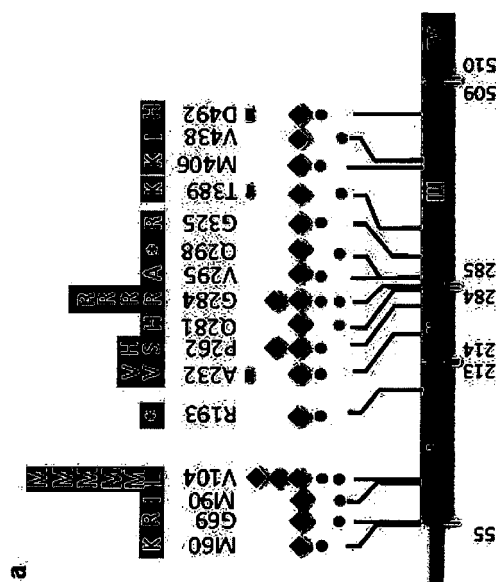
【図 3】

```

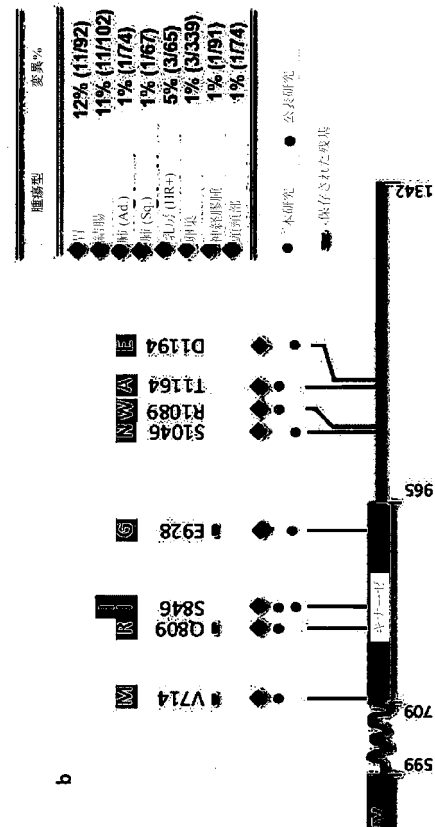
1 mrandalqvl glifalarg evngsqavpc gtlnglsvtg daenqygtly klyercevmm
61 gnleivltgh nadlsflqwi revtgyviva mnefatlpip nlrvtvrtqv ydgkfaifvm
121 lnyntnsha lrqlrltqlt ellsggyvie kndklchmdr idwrdivdr daeivvkdn
181 rscppchevc kgrcwggpse dcgtltktic apqngchfg pnpqgcchde caggcsgpdd
241 tdcfacrhfn dsqacvrcp qplvynkltf glepnphcty qygyvvasc phnfvdqts
301 cvracppdkm evdknglkmc epogglcpka cagtgagrf qtdaanidg fvnctkilgn
361 ldlitlglng dphkhlpalp peklnvfrlv reitgyiniq swppnmhns vfnslrttgg
421 rslrynrgfsl lmknlntvs lgrfslkeis agriysanc qlychshlnv tkvlrgptee
481 ridikhnrpr rdcvaekvc dplcssggw gpgpgqclsc rnyrrggvvc thcnflngp
541 refaheaecf schpccpme gtatcngsgs dtcaqcahfr dgphcvsscp hgvlgakpi
601 ykypdvqnc rpchenctgg ckpgelqdc l gqtlvliigt hlmtaltvia glvfvmmig
661 gtflvyrgr iqnkramry lergesiepl dpsekankvl arifketelr klkvlgsgvf
721 gtvhkgwvip egesikpvc ikviedksgr qsfqavtdhm laigaldhah ivrlrlgcp
781 sslqlvtqyl pigslldhvr qhrgalpql llnwvqiax gmyyleehgm vhrnlaarv
841 llkspaqvq adgvadilp pddkqlyse aktipkwal eshfkkyth qsdwsgyvt
901 vvelmtfeg pyagrlaev pdllekerl aapqictid ymavkwmv denirptfke
961 laneftmar dprrylvikr esgpiappp ephgltnkl eevelepeld ldldeaeed
1021 nlatttlgsa lslpvtltn prgsqallsp ssqymnmng nlgesqesa vsgssercpr
1081 pvsllhmpgr classessegh vtgseaelqe kvmcrcsrz srsprrqds ayhsqrshll
1141 tptvplspg leeedvngyv mpdthlkgtp srregtlssv glssvltgee ededeeyeym
1201 nrzrhspgh pprpsleol gycyndvgsd lsaslgstqs cplhpvpimp tagtttpeedy
1261 eynmrrqdgq gpggdyaaag acpaseqgye emrafqpgph qaphvyarl ktirleatd
1321 safdnpywh slrfpkanaq rt

```

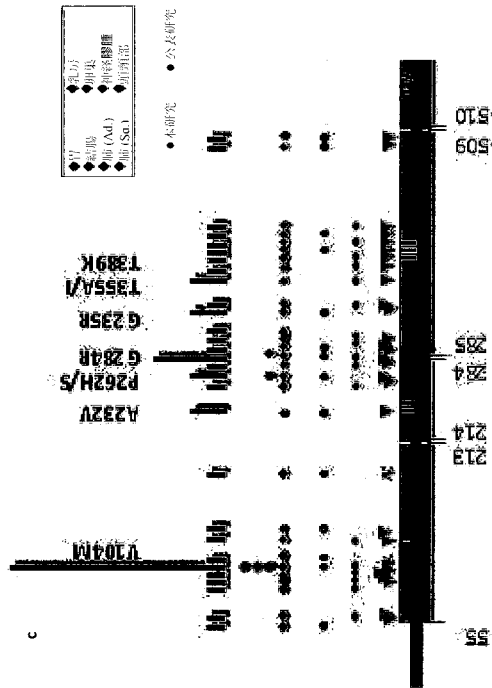
【図 4 a】



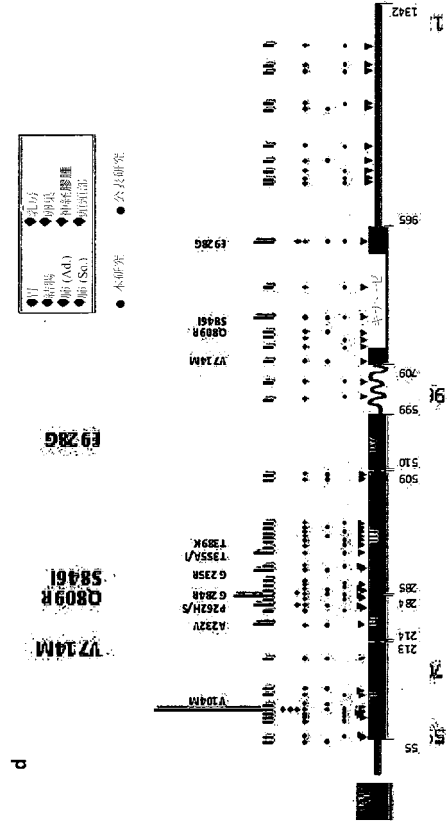
【図 4 b】



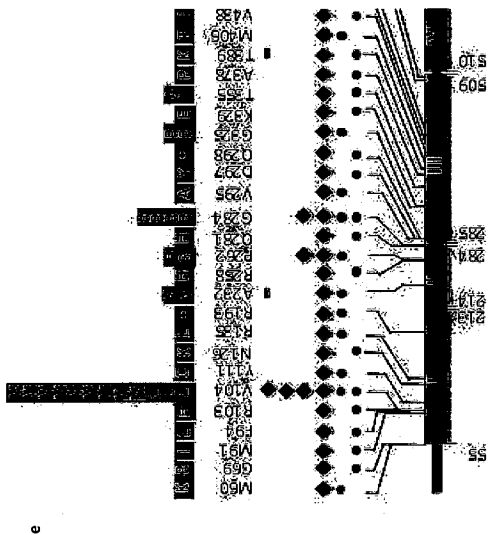
【図 4 c】



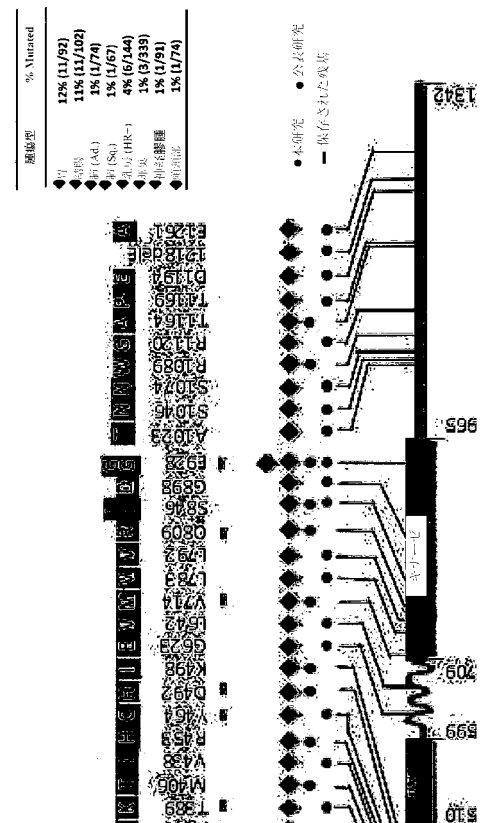
【図 4 d】



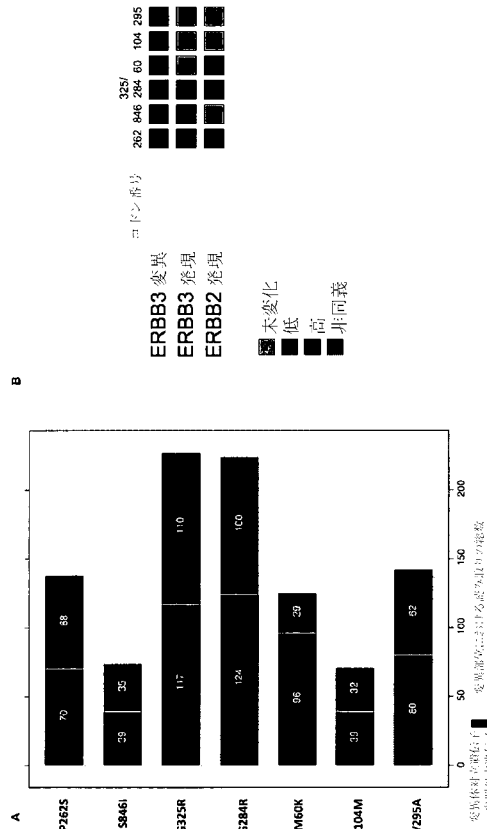
【図 4 e】



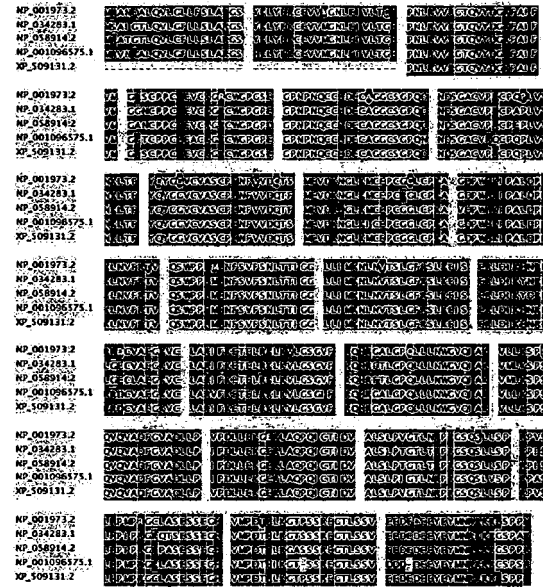
【図 4 f】



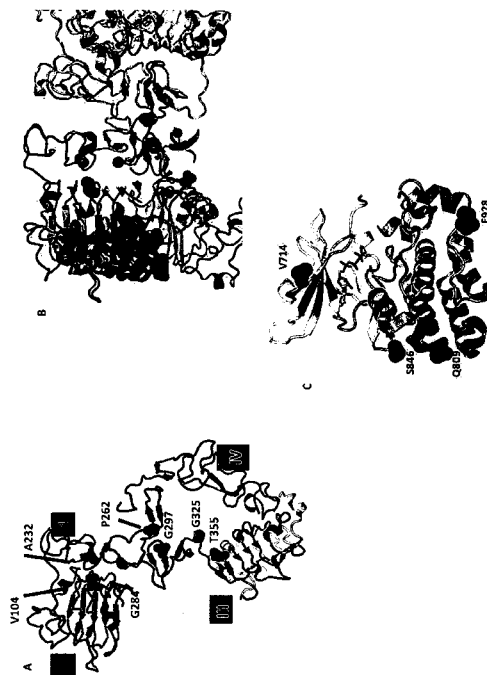
【 図 5 】



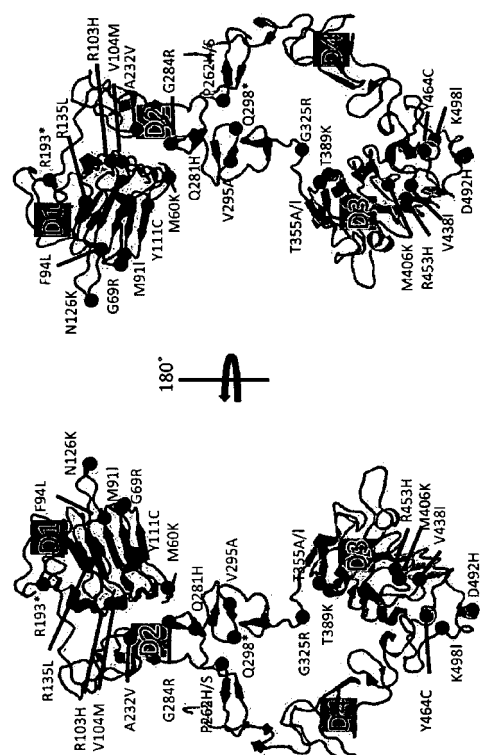
【 図 6 】



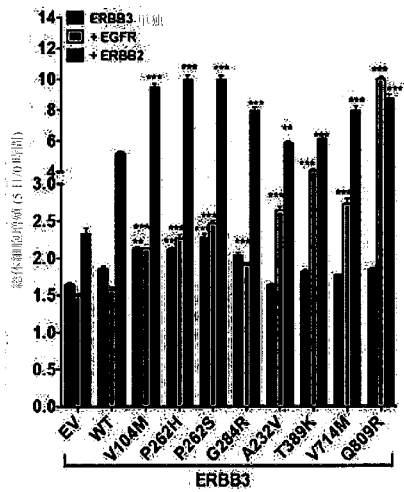
【 図 7 】



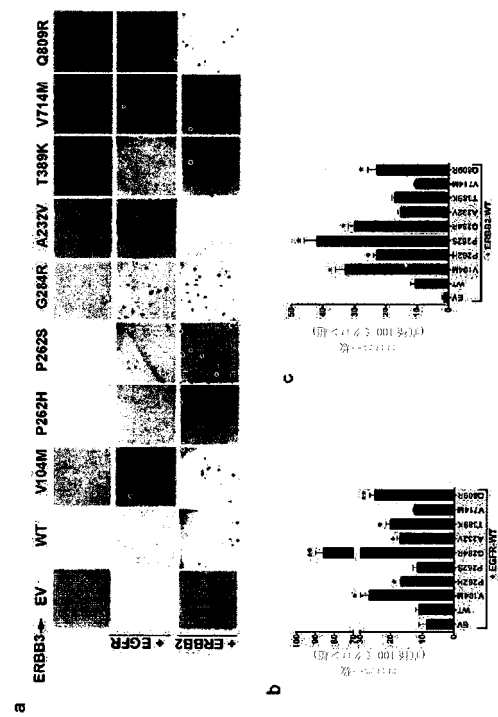
【 図 8 】



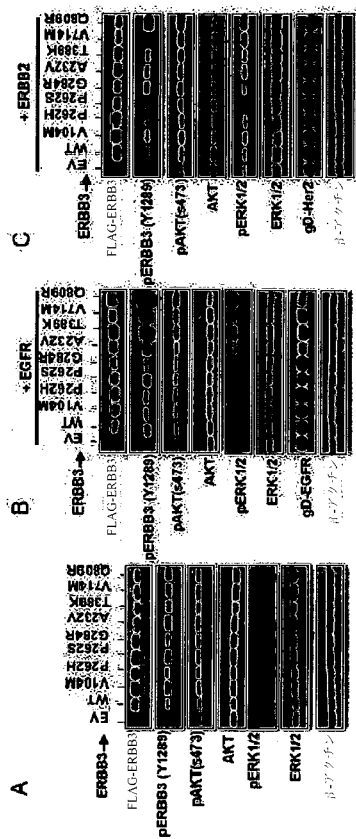
【図 9】



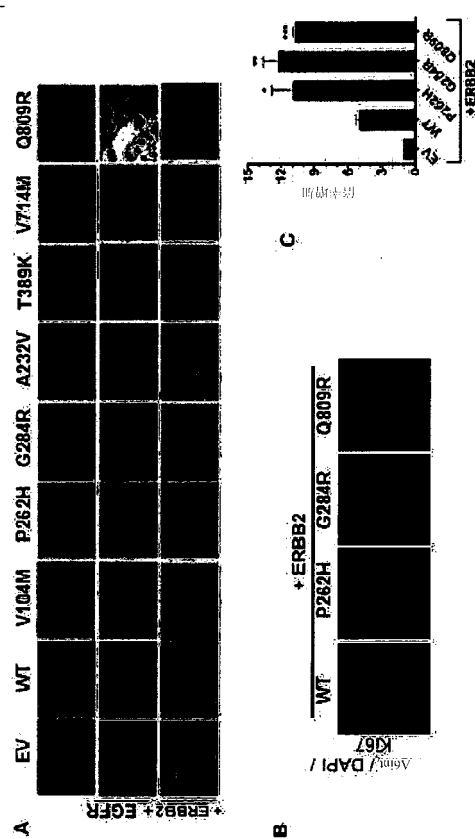
【図 10】



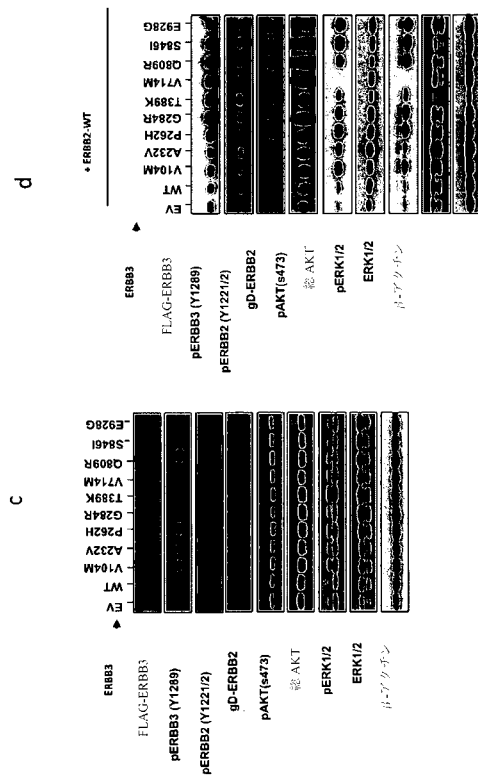
【図 11】



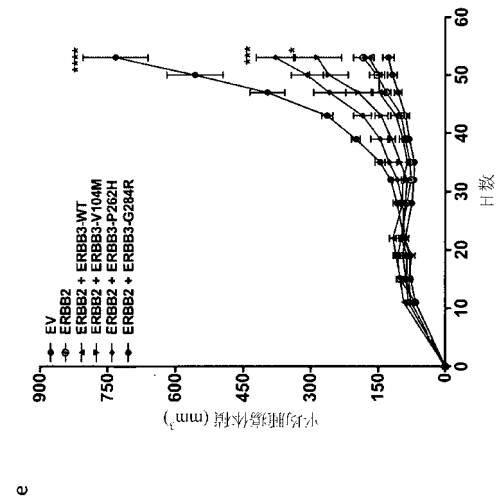
【図 12】



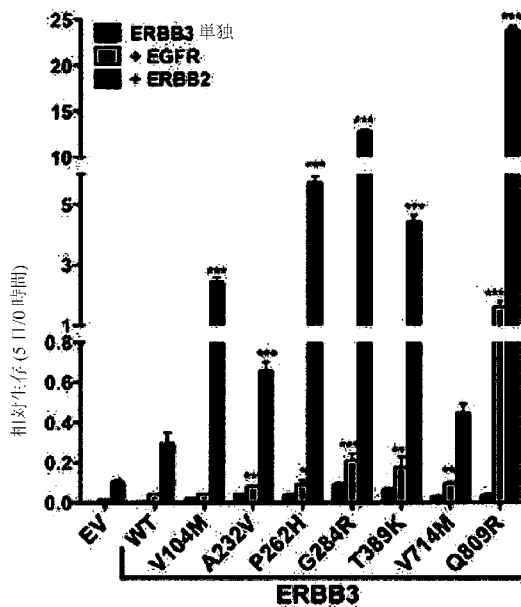
【図 13 B (c - d)】



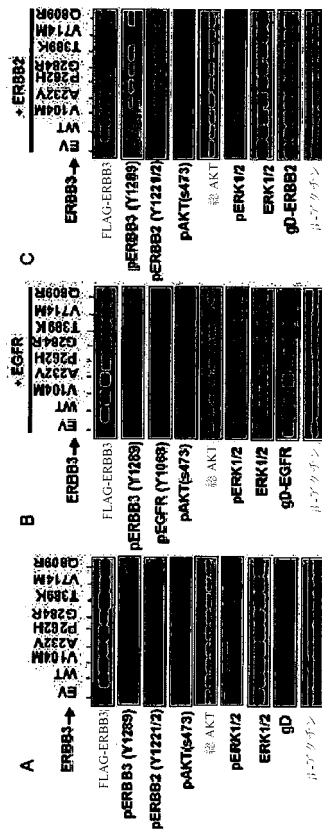
【図 13 B (e)】



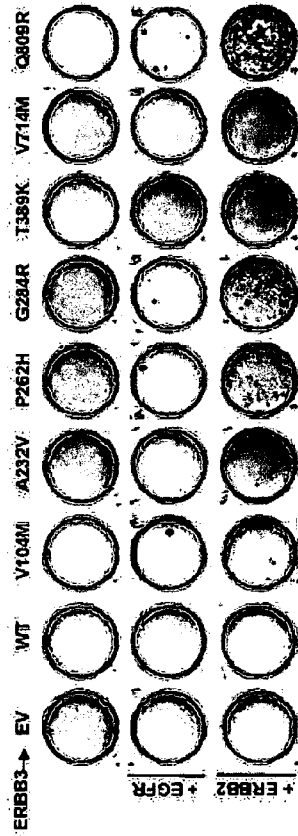
【図 14】



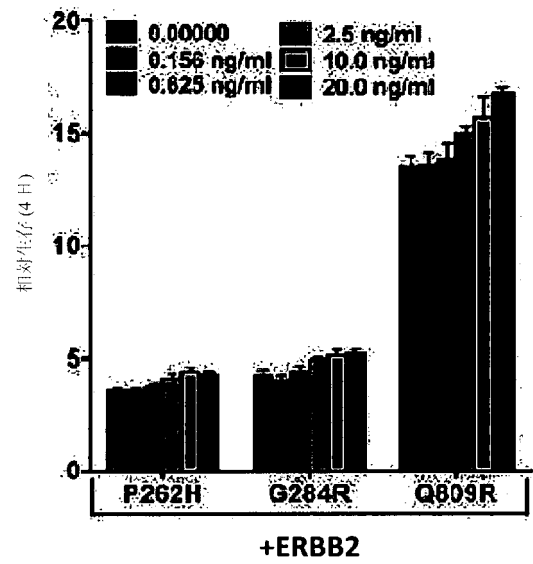
【図 15】



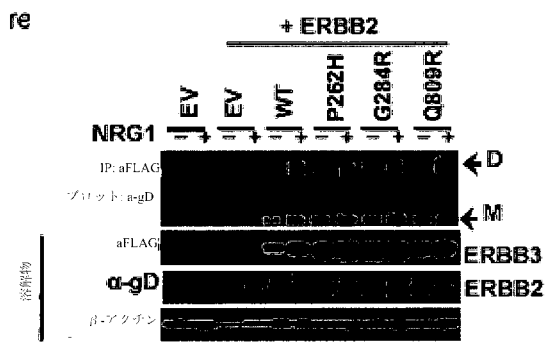
【図 16】



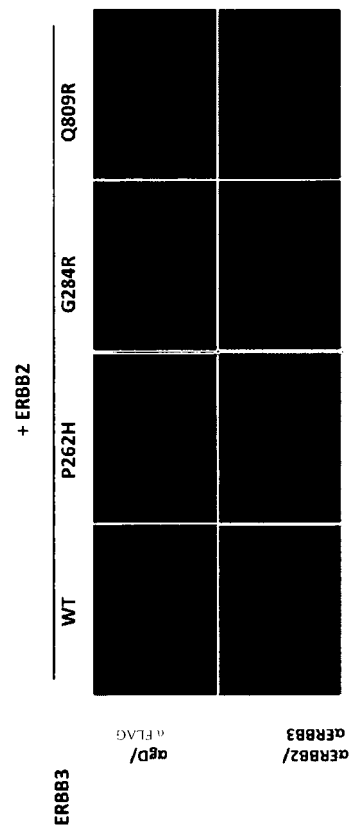
【図 17】



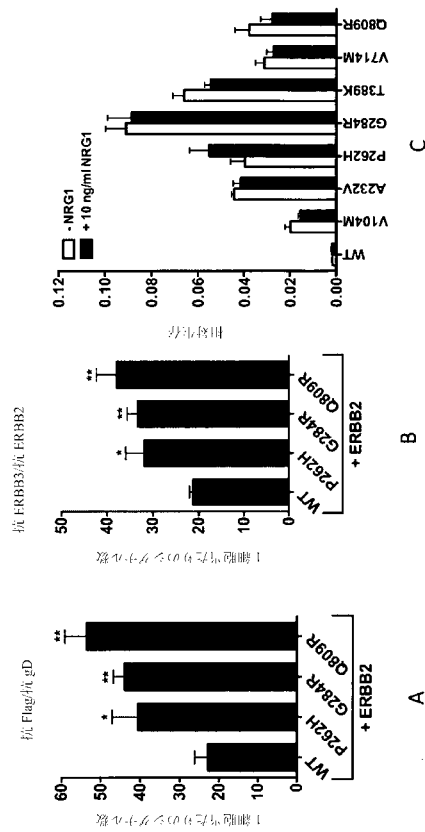
【図 18】



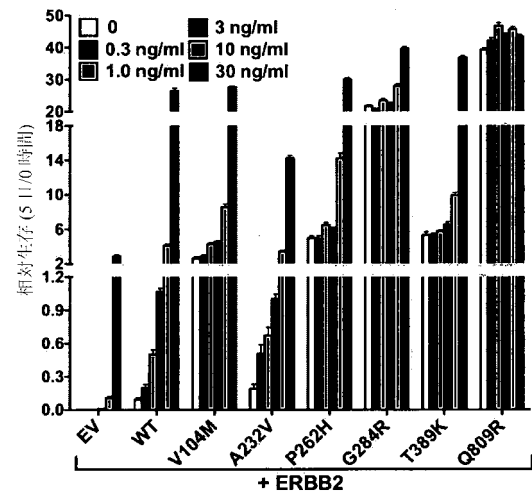
【図 19】



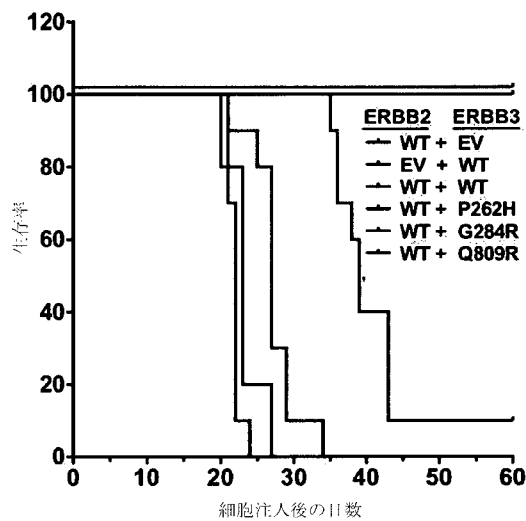
【図 20】



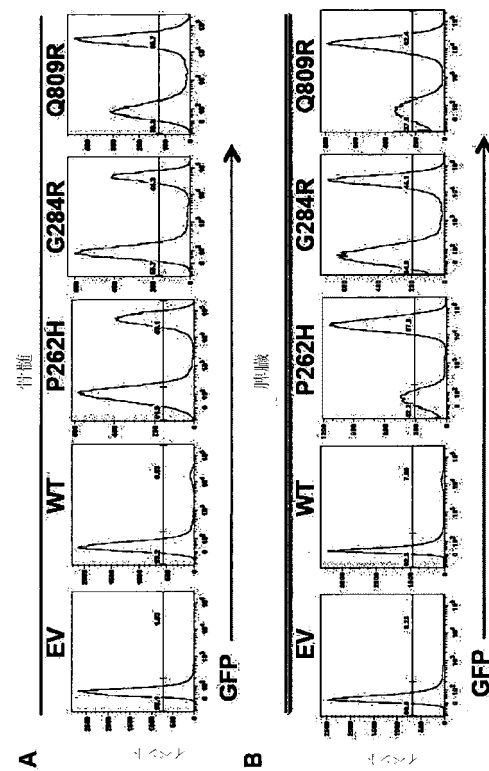
【図 21】



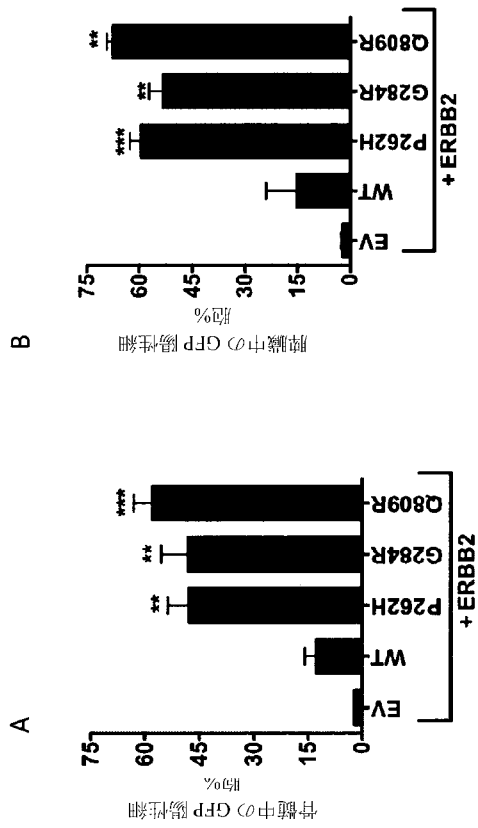
【図 22】



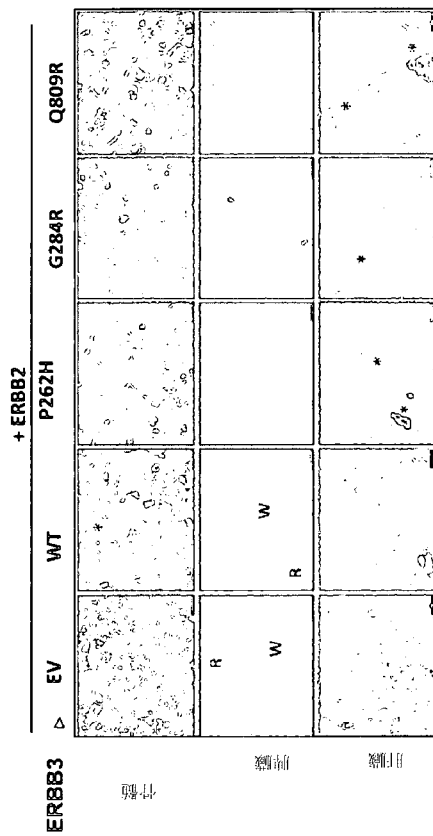
【図 23】



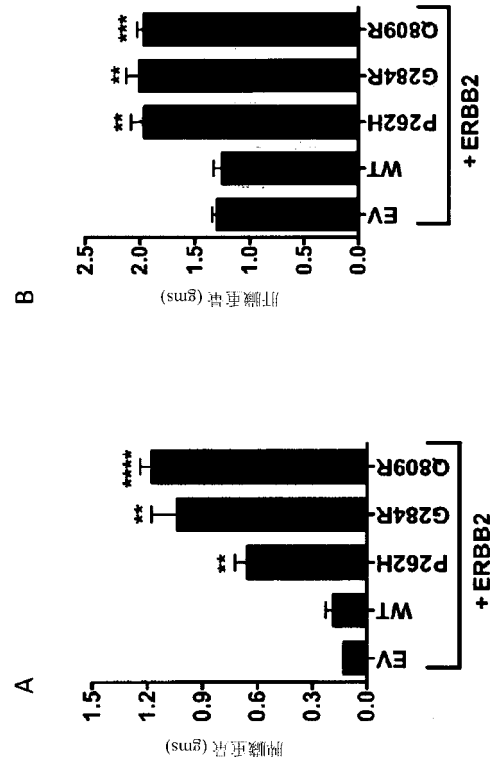
【図 2 4】



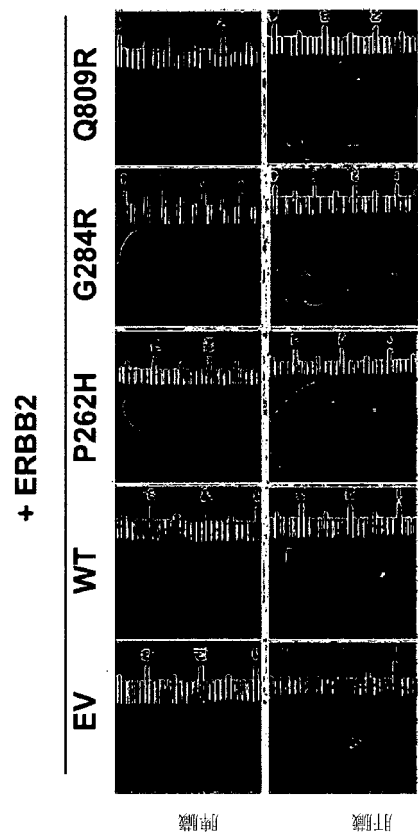
【図 2 6】



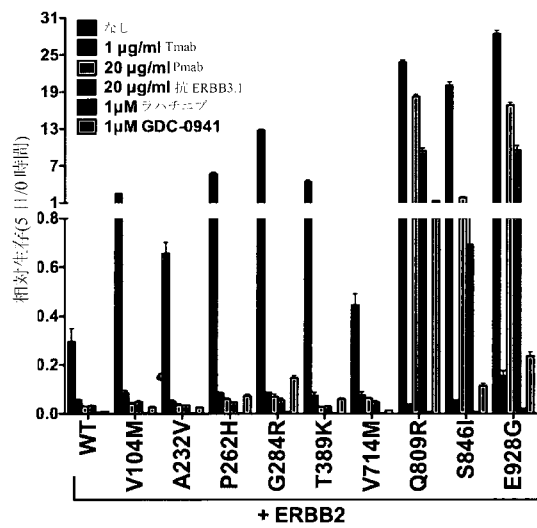
【図 2 5】



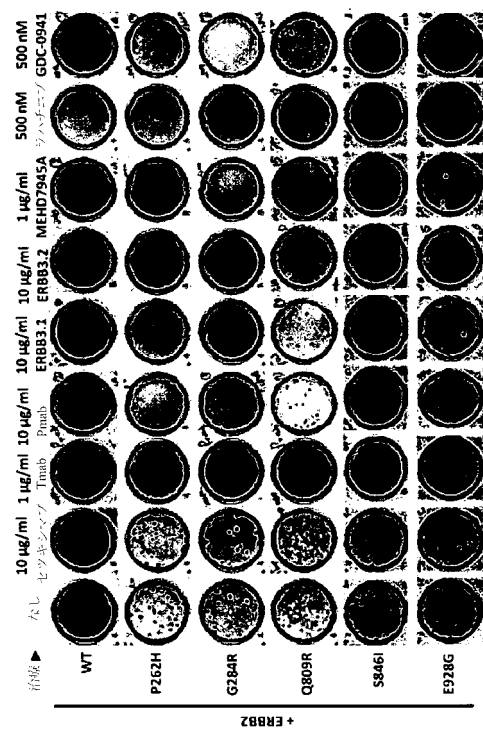
【図 2 7】



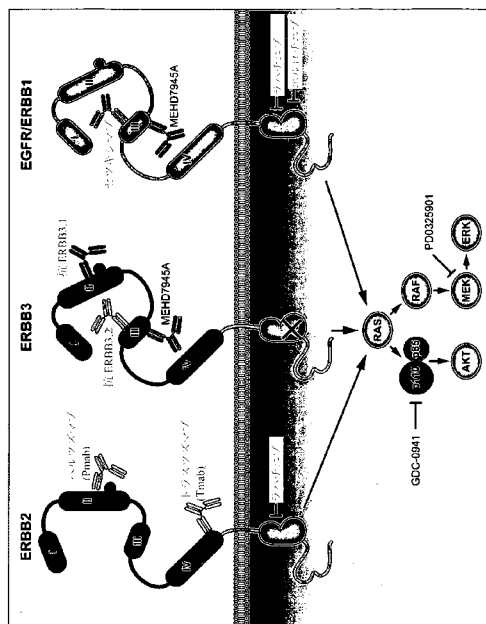
【図 28】



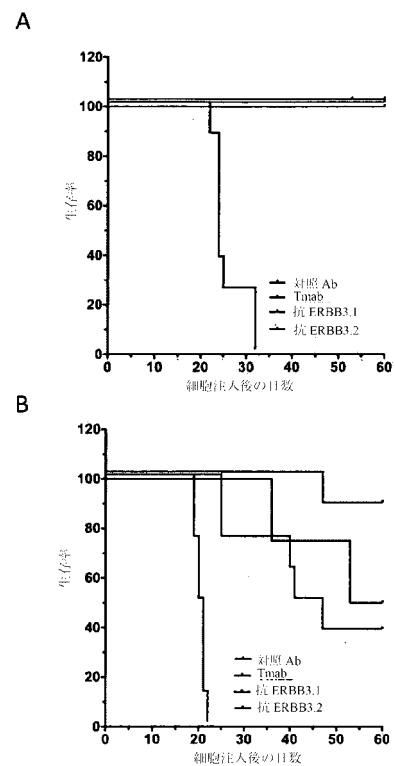
【図 29】



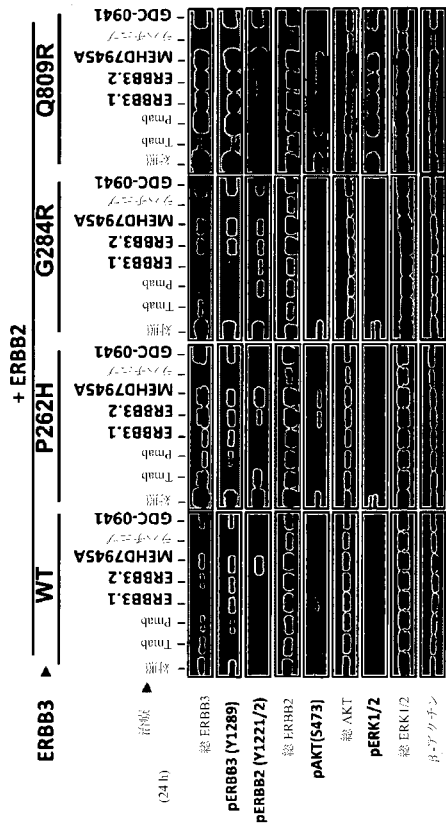
【図 30】



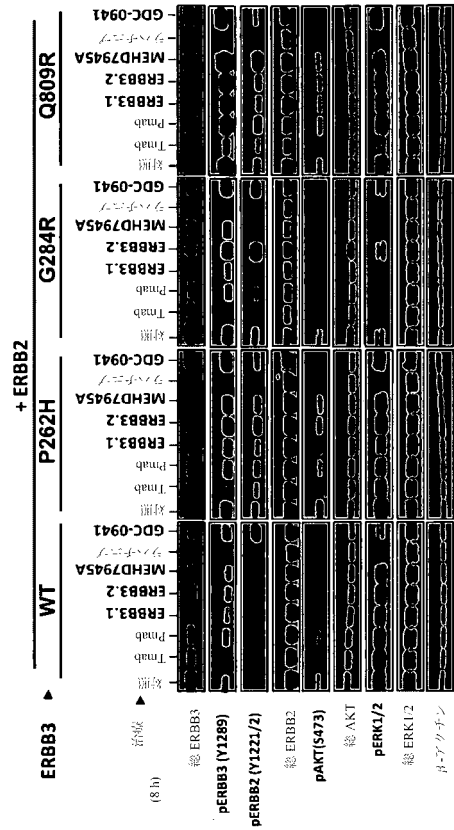
【図 31】



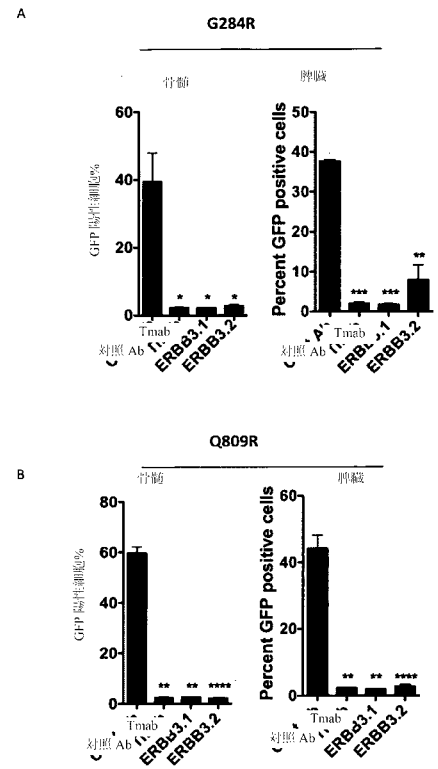
【図 3 2】



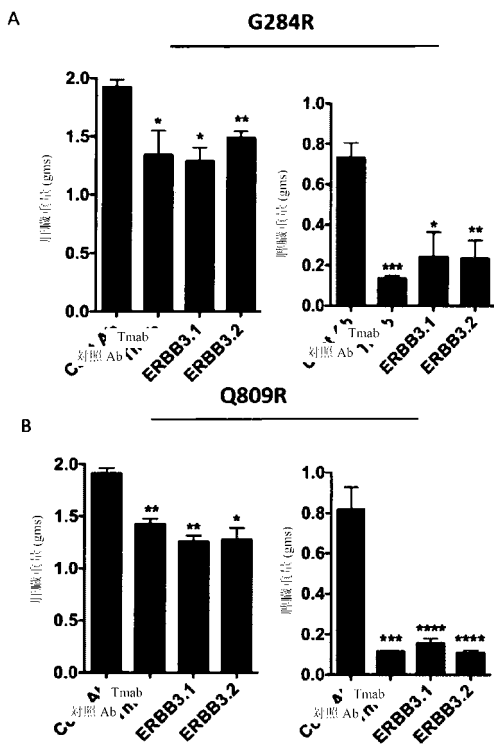
【図 3 3】



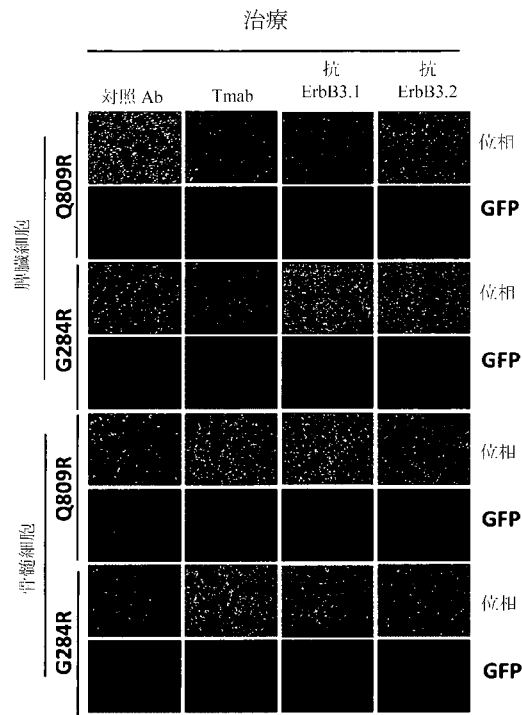
【図 3 4】



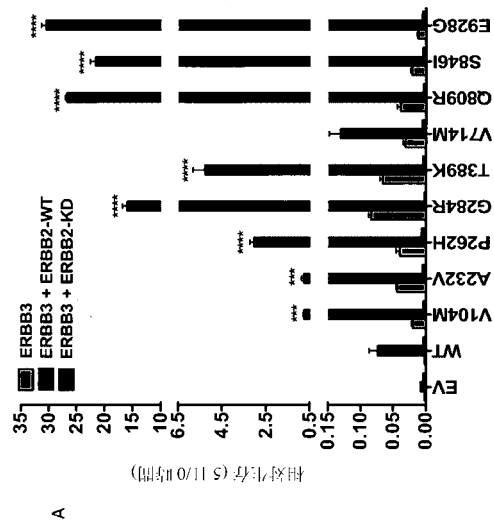
【図 3 5】



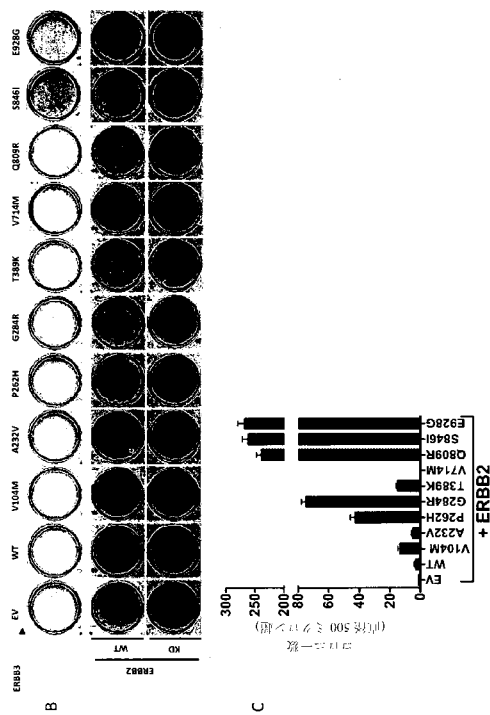
【図 3 6】



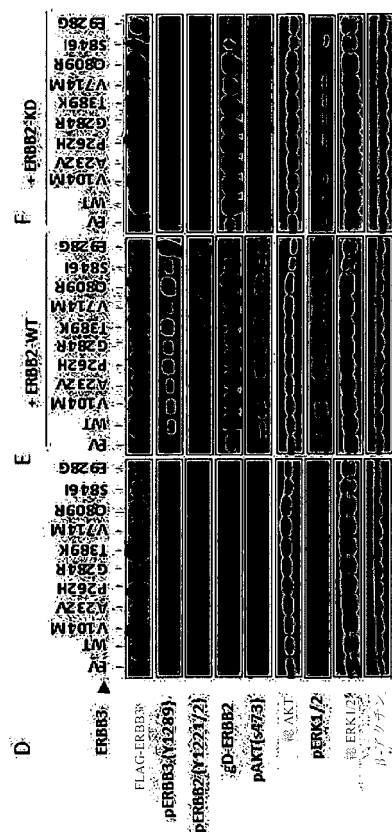
【図 3 7 (A)】



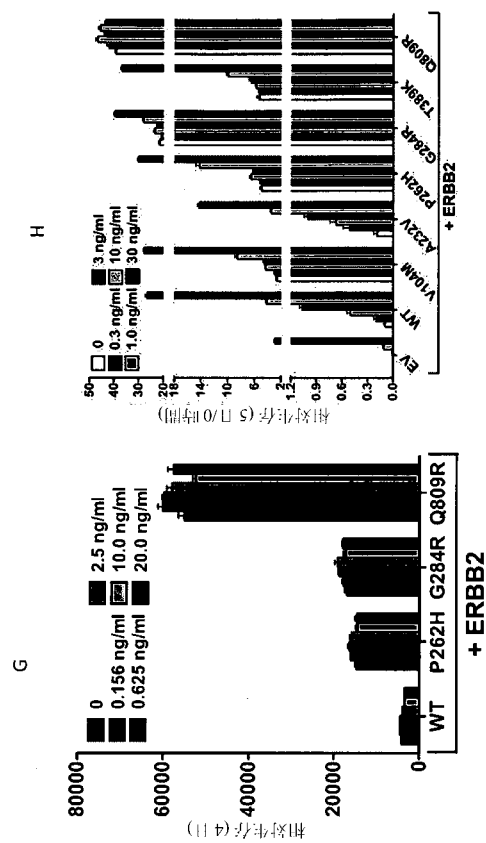
【図 3 7 (B - C)】



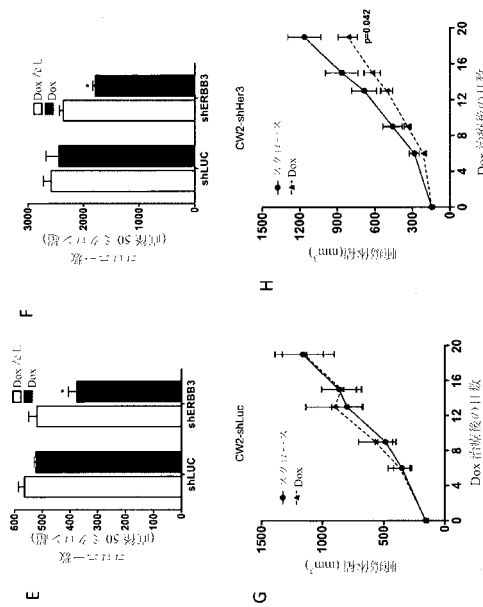
【図 3 7 (D - F)】



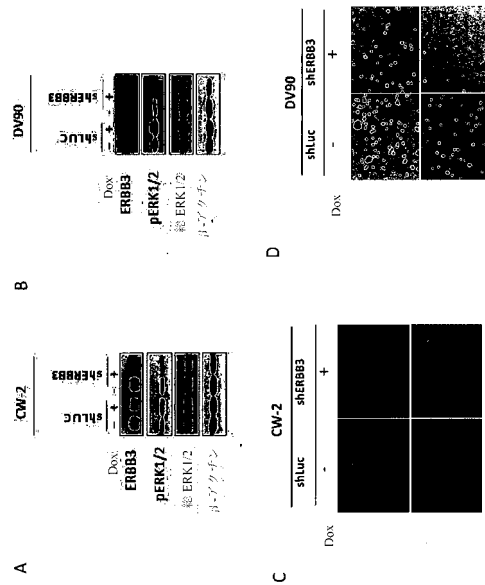
【図 37 (G - H)】



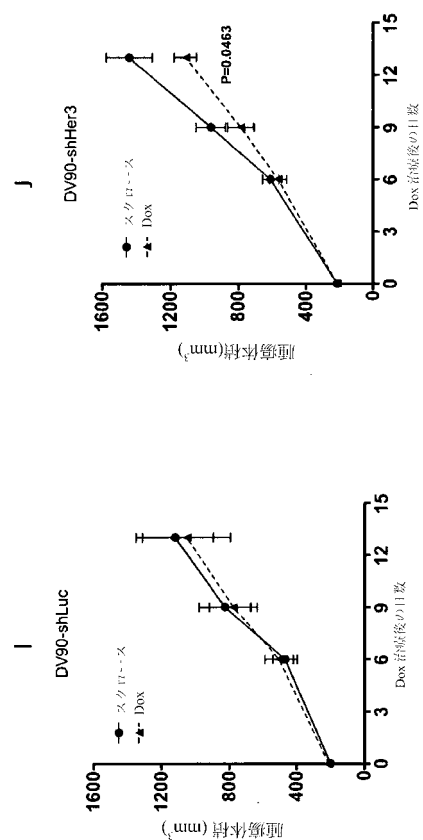
【図 38 (E - H)】



【図 38 (A - D)】



【図 38 (I - J)】



ccagctggaggaacac	ctctttaaagctcatcttggaatcatccgatgaaaccaaggt	
PRGS GSG	S LLLSLSPSSSGYMPNMPSG	1060
aatcttgggastctctgcagaagatctgcaggtctctggggacagtgaaagcgtgcgcccg		
1080	LLNGGESCQESAVSGSSGSSERCPR	1080
ccagctctctctacccaatgccc	C gtgagtgcttgcgcatcagagatctctcagaggggcat	
PVSLHAPMGP	R GLCLATASESSSESGH	1100
gtacacaggtctgaaggtcagctccaggaagaaggtctcaagttctgaagagccggagacag		
VTGSG	LEQLQEK	1120
ccagctccccaagcagagcagagatagagctacacatccaccagccagctctgctg		
1140	SRSPRPRLRGDSAYHSQRHSLSL	1140
acctctgtttaccacctctccccaccgggtgtagagaacagagatgcacagcgttatgtc		
TPVTL	SLPPLGLEEDVNGYV	1160
atgccagat	A ccacacctcaaaagtctccctctcccggaagggacacctctcttcagtg	
MPD	T HLKKGTPR	1180
gggttcagctctctctctgggtcttgagaaagaagatgagaaatgagagatgagatcatct		
1200	SLSPRSLSEEFYV	1200
aacgggaggaggaagacagctcacctctccccctatggcgaagttcccttgag	A gtctg	
NRNR	RHSPHPHPRPSSLEEL	1220
gggtatgagatcacatgtctggggtcagacatcagtgctctctctgggcagacacagagat		
1240	GYRYMDGVGSDLSASLGLSTQS	1240
tgcccacctccacctgtaccctcatgccacctgcggcgacacatccagatgaagacat		
1260	CPFLHPFIMPTAGTTPD	1260
gagatagtgagatgcagagagagagagagatccaggggtctgagagagagagagagag		
1280	YMNRRDGGGPGGGLYAMMG	1280
gcctgcgcagcatctgcagcaaggtgtatgaagagatgagagctttcagggcgctggagcat		
1300	ACPASEGYEEMRAFGFGFH	1300
caggcccccacatctcattatgcccctcaaaaactctcagtagctctagagagctcacag		
1320	CTGPHVHYARLKLTLASLEATD	1320
tdgtccttggataaacctgataactctgcatgacagggctttcccccaagctaatccagca		
1340	SDYWHSLRFLPKANAYQ	1340
aaagacgttaa	(SEQ ID NO: 231)	
R	T	(SEQ ID NO: 230)

【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	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 ----- -/-	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

13 May 2013

Date of mailing of the international search report

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 02-09-2009
			JP 2010511382 A 15-04-2010
			SG 177225 A1 30-01-2012
			US 2011008347 A1 13-01-2011
			WO 2008066498 A1 05-06-2008

WO 2008061213	A2	22-05-2008	AT 527385 T 15-10-2011
			AU 2007319214 A1 22-05-2008
			CA 2667851 A1 22-05-2008
			EP 2082064 A2 29-07-2009
			ES 2374954 T3 23-02-2012
			JP 2010509922 A 02-04-2010
			US 2010092965 A1 15-04-2010
			WO 2008061213 A2 22-05-2008

WO 03011897	A1	13-02-2003	US 2003143568 A1 31-07-2003
			US 2006177907 A1 10-08-2006
			WO 03011897 A1 13-02-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 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, ソマセカー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0 , 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