

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 3 部門第 2 区分

【発行日】平成29年4月13日 (2017.4.13)

【公表番号】特表2016-515508(P2016-515508A)

【公表日】平成28年5月30日 (2016.5.30)

【年通号数】公開・登録公報2016-033

【出願番号】特願2016-502111(P2016-502111)

【国際特許分類】

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/02 (2006.01)

C 0 7 K 14/71 (2006.01)

C 0 7 K 16/26 (2006.01)

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/40 (2006.01)

C 1 2 N 9/12 (2006.01)

C 1 2 N 9/16 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 31/7105 (2006.01)

A 6 1 K 31/711 (2006.01)

A 6 1 K 31/713 (2006.01)

A 6 1 K 31/496 (2006.01)

A 6 1 K 31/506 (2006.01)

A 6 1 K 31/525 (2006.01)

A 6 1 K 31/4439 (2006.01)

A 6 1 K 31/17 (2006.01)

A 6 1 K 31/53 (2006.01)

A 6 1 K 31/517 (2006.01)

A 6 1 K 31/404 (2006.01)

A 6 1 K 31/5025 (2006.01)

A 6 1 K 31/47 (2006.01)

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 25/00 (2006.01)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【 F I 】

C 0 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 C

C 0 7 K 14/71

C 0 7 K 16/26

C 0 7 K 16/28

C 0 7 K 16/40

C 1 2 N 9/12

C 1 2 N 9/16 B

C 1 2 Q 1/68 A

A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	31/7105	
A 6 1 K	31/711	
A 6 1 K	31/713	
A 6 1 K	31/496	
A 6 1 K	31/506	
A 6 1 K	31/525	
A 6 1 K	31/4439	
A 6 1 K	31/17	
A 6 1 K	31/53	
A 6 1 K	31/517	
A 6 1 K	31/404	
A 6 1 K	31/5025	
A 6 1 K	31/47	
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	25/00	
G 0 1 N	33/53	M
G 0 1 N	33/53	D

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月10日(2017.3.10)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象からのサンプルが E G F R 融合の存在を示すかどうかを測定するための診断キットであって、E G F R 融合、またはその一部と特異的にハイブリダイゼーションする少なくとも 1 つのオリゴヌクレオチドを含み、前記 E G F R 融合が、

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、

(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または

(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質

に融合される E G F R のチロシンキナーゼドメインを含む、キット。

【請求項 2】

前記オリゴヌクレオチドが、1 セットの核酸プライマーまたはインサイチュウハイブリダイゼーションプローブを含む、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

前記オリゴヌクレオチドが、配列番号 3 2、3 3、3 4、3 5、3 8、3 9、4 0、4 1、4 4、4 5、8 7、または 8 8 を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 4】

E G F R 融合が存在する場合にのみ、前記プライマーがポリメラーゼ反応を誘発する、請求項 2 または 3 に記載のキット。

【請求項 5】

前記セブチンタンパク質が、セブチン - 1、セブチン - 2、セブチン - 3、セブチン - 4、セブチン - 5、セブチン - 6、セブチン - 7、セブチン - 8、セブチン - 9、セブチン -

ン - 10、セブチン - 11、セブチン - 12、セブチン - 13、またはセブチン - 14 である、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 6】

前記セブチンタンパク質が、セブチン - 14 (S E P T 1 4) である、請求項 5 に記載のキット。

【請求項 7】

前記 C A N D タンパク質が、C A N D 1、C A N D 2、または C A N D 3 である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8】

前記 C A N D タンパク質が、C A N D 1 である、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

前記融合タンパク質が、E G F R - S E P T 1 4 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 1 融合タンパク質である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 10】

前記測定が、遺伝子配列決定、選択的ハイブリダイゼーション、選択的増幅、遺伝子発現分析、またはその組み合わせを含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 11】

対象からのサンプルが E G F R 融合タンパク質の存在を示すかどうかを測定する診断キットであって、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16、または 8495 を含む E G F R 融合タンパク質に特異的に結合する抗体を含み、E G F R 融合タンパク質が存在する場合にのみ、前記抗体が前記タンパク質を認識する、キット。

【請求項 12】

前記融合タンパク質が、E G F R - S E P T 1 4 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 1 融合タンパク質である、請求項 11 に記載のキット。

【請求項 13】

ヒト対象における E G F R 融合の存在の検出方法であって、

(a) 前記ヒト対象からの生体サンプルを得ること、および

(b) E G F R 融合が前記対象に存在するかどうかを検出することを含む、前記 E G F R 融合が、

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、

(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または

(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質

に融合される前記 E G F R のチロシンキナーゼドメインを含む、方法。

【請求項 14】

前記検出が、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16、もしくは 8495 に対する抗体を用いる E L I S A、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16、もしくは 8495 に対する抗体を用いるウエスタンブロット、質量分析、等電点分離法、またはその組み合わせにより E G F R 融合タンパク質レベルを測定することを含む、請求項 13 に記載方法。

【請求項 15】

ステップ (b) の前記検出が、前記対象における E G F R 融合タンパク質をコードする核酸配列が存在するかどうかを検出することを含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記核酸配列が、配列番号 2、4、8、10、14、または 15 のいずれか 1 つを含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

前記検出が、E G F R 融合を検出するためのハイブリダイゼーション、増幅、または配列決定法を用いることを含む、請求項 15 または 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記増幅が、配列番号 32、33、34、35、38、39、40、41、44、45、87、または88 を含むプライマーを用いる、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記 E G F R 融合 が、E G F R - S E P T 14 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 1 融合タンパク質 である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 20】

前記 E G F R 融合 が、E G F R - S E P T 14 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 1 融合タンパク質 である、請求項 15 から 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 21】

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、
(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または
(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質
を含むポリペプチドに融合される E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメイン を含む、精製融合タンパク質に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 22】

前記融合タンパク質が、E G F R - S E P T 14、E G F R - C A N D 1、または E G F R - P S P H である、請求項 21 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 23】

前記 E G F R - S E P T 14 融合タンパク質 が、配列番号 1、3、または5 のアミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 24】

前記 E G F R - C A N D 1 融合タンパク質 が、配列番号 13、16、または8495 のアミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 25】

前記 E G F R - P S P H 融合タンパク質 が、配列番号 7、9、または11 のアミノ酸配列を含む、請求項 22 に記載の抗体または抗原結合断片。

【請求項 26】

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、
(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または
(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質
に融合する、E G F R のチロシンキナーゼドメインを含む融合タンパク質をコードする c D N A。

【請求項 27】

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、
(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または
(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質
に融合する、E G F R のチロシンキナーゼドメインを含む、精製融合タンパク質。

【請求項 28】

(i) セブチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、
(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または
(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質
を含むポリペプチドに融合される、E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメイン を含む、対象における融合タンパク質の発現レベルまたは活性を減少させる組成物であって、前記融合タンパク質の阻害剤を含む薬学的に許容可能な担体と混合されている組成物。

【請求項 29】

有効量の E G F R 融合分子阻害剤 を対象に投与することを含み、それを必要とする前記対象における固形腫瘍の増殖の減少方法であって、前記阻害剤が前記固形腫瘍のサイズを

減少させ、

前記 E G F R 融合が

(i) セプチンタンパク質のコイルドコイルドメイン、

(i i) ホスホセリンホスファターゼ (P S P H) タンパク質、または

(i i i) カリン関連 N E D D 化解離 (C A N D) タンパク質

に融合される、前記 E G F R の前記チロシンキナーゼドメインを含む、方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 4】

政府援助

本発明は、米国国立がん研究所から認可番号 C A 1 0 1 6 4 4 助成金番号 R 0 1 C A 1 0 1 6 4 4 のもとに、政府援助によりなされた。政府は、本発明において所定の権利を有する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 9】

本発明の一態様は、配列番号 1 0 を含む遺伝的切断点を有する、精製された E G F R - P S P H 融合タンパク質に関する。一実施形態では、前記精製融合タンパク質は、他のヒトタンパク質を実質的に含まない。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 0】

本発明の一態様は、配列番号 1 3 または 8 4 9 5 を含む、精製された E G F R - C A N D 1 融合タンパク質に関する。一実施形態では、前記精製融合タンパク質は、他のヒトタンパク質を実質的に含まない。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 7】

本発明の一態様は、配列番号 1 5 を含む遺伝的切断点を有する、E G F R - C A N D 1 融合タンパク質をコードする合成核酸に関する。

【手続補正 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 8】

本発明の一態様は、E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメインを構成的に活性化するポリペプチドに融合される前記 E G F R タンパク質の前記チロシンキナーゼドメイン

を含む、精製融合タンパク質に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片に関する。一実施形態では、前記融合タンパク質は、E G F R - S E P T融合タンパク質、E G F R - P S P H融合タンパク質、またはE G F R - C A N D融合タンパク質である。別の実施形態では、前記E G F R - S E P T融合タンパク質は、E G F R - S E P T 1 4である。一実施形態では、前記E G F R - S E P T融合タンパク質は、配列番号1、3、または5のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、前記E G F R - C A N D融合タンパク質は、E G F R - C A N D 1である。一実施形態では、前記E G F R - C A N D融合タンパク質は、配列番号1 3、1 6、または8 4 9 5のアミノ酸配列を含む。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 1】

本発明の一態様は、カリン関連N E D D化解離(C A N D)タンパク質を含むポリペプチドに融合されるE G F Rタンパク質のチロシンキナーゼドメインを含む、精製融合タンパク質に特異的に結合する、抗体またはその抗原結合断片に関する。一実施形態では、前記E G F R - C A N D融合タンパク質は、E G F R - C A N D 1である。一実施形態では、前記E G F R - C A N D融合タンパク質は、配列番号1 3、1 6、または8 4 9 5のアミノ酸配列を含む。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 6】

本発明の一態様は、対象からのサンプルがE G F R融合の存在を示すかどうかを測定するための診断キットであって、E G F R融合、またはその一部と特異的にハイブリダイゼーションする少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを含む前記キットに関する。一実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、1セットの核酸プライマーまたはインサイチュウハイブリダイゼーションプローブを含む。別の実施形態では、前記オリゴヌクレオチドが、配列番号3 2、3 3、3 4、3 5、3 6、3 7、3 8、3 9、4 0、4 1、4 2、4 3、4 4、4 5、8 7、8 8もしくは8 9、またはその組み合わせを含む。さらなる実施形態(em n b o d i m e n t)では、E G F R融合が存在する場合にのみ、前記プライマーがポリメラーゼ反応を刺激する。いくつかの実施形態(e m d o i m e n t)では、前記融合タンパク質は、E G F R - S E P T 1 4融合タンパク質、E G F R - P S P H融合タンパク質、またはE G F R - C A N D 1融合タンパク質である。他の実施形態では、前記測定が、遺伝子配列決定、選択的ハイブリダイゼーション、選択的増幅、遺伝子発現分析、またはその組み合わせを含む。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 7】

本発明の一態様は、対象からのサンプルがE G F R融合タンパク質の存在を示すかどうかを測定する診断キットであって、配列番号1、3、5、7、9、11、13、1 6、または8 4 9 5を含むE G F R融合タンパク質に特異的に結合する抗体を含み、E G F R融合タンパク質が存在する場合にのみ、前記抗体が前記タンパク質を認識する前記キットに関する。一実施形態では、前記融合タンパク質はE G F R - S E P T 1 4融合タンパク質

、EGFR-PSPH融合タンパク質、またはEGFR-CAND1融合タンパク質である。一実施形態では、前記対象は、遺伝子融合に関連する癌を患う。一実施形態では、前記遺伝子融合に関連する癌が、多形膠芽腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、または結腸直腸癌を含む。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

本発明の一態様は、ヒト対象におけるEGFR融合の存在を検出する方法に関する。前記方法は、前記ヒト対象からの生体サンプルを得ることと、EGFR融合が前記対象に存在するかどうかを検出することを含む。一実施形態では、前記検出が、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16、または8495に対する抗体を用いるELISA、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16、または8495に対する抗体を用いるウエスタンブロット、質量分析、等電点分離法、またはその組み合わせによりEGFR融合タンパク質レベルを測定することを含む。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0039

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0039】

本発明の一態様は、ヒト対象におけるEGFR融合の存在を検出する方法に関する。前記方法は、ヒト対象からの生体サンプルを得ることと、前記対象におけるEGFR融合タンパク質をコードする核酸配列が存在するかどうかを検出することを含む。一実施形態では、前記核酸配列が、配列番号2、4、8、10、14、及び15のいずれか1つを含む。別の実施形態では、前記検出が、EGFR融合を検出するためのハイブリダイゼーション、増幅、または配列決定法を用いることを含む。さらなる実施形態では、前記増幅が、配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88または89を含むプライマーを用いる。いくつかの実施形態では、前記融合タンパク質は、EGFR-SEPT14融合タンパク質、EGFR-PSPH融合タンパク質、またはEGFR-CAND1融合タンパク質である。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0041

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0041】

【図1A】図1Aは、MutComFocalによる3つのカテゴリのそれぞれの最上位にスコア付けされる確認されたGBM遺伝子のクロモソームビューである。プロットは、有意なコピー数の変更なしに変異した遺伝子を示す(Mut、変異%、変異の頻度)。これまでに知られるGBM遺伝子は緑(白黒画像ではライトグレー)で示され、新たに単独で確認されたGBM遺伝子は赤(白黒画像ではダークグレー)で示される。

【図1B】図1Bは、MutComFocalによる3つのカテゴリのそれぞれの最上位にスコア付けされる確認されたGBM遺伝子のクロモソームビューである。プロットは、局所性的及び再発的増幅の領域における変異した遺伝子を示す(Amp-Mut、増幅/変異スコア)。これまでに知られるGBM遺伝子は緑(白黒画像ではライトグレー)で示され、新たに単独で確認されたGBM遺伝子は赤(白黒画像ではダークグレー)で示される。

【図1C】図1Cは、MutComFocalによる3つのカテゴリのそれぞれの最上位にスコア付けされる確認されたGBM遺伝子のクロモソームビューである。プロットは、局所性的及び再発的欠失の領域における変異した遺伝子を示す(De1-Mut、欠失/変異スコア)。これまでに知られるGBM遺伝子は緑(白黒画像ではライトグレー)で示され、新たに単独で確認されたGBM遺伝子は赤(白黒画像ではダークグレー)で示される。

【図2A-B】図2A~Bは、LZTR-1における変更された残余の局所化(Localization)を示す。図2Aは、LZTR-1及びFlag-Cul3野生型(WT)を発現するベクターにより遺伝子導入された293T細胞由来のライセートを示し、Flag-Cul3-ドミナントネガティブ(DN)または空のベクターは、Flag抗体で免疫沈降され、示される抗体でウェスタンブロットによりアッセイされた。*、非特異的バンド；左のブラケットはCul3ポリペプチドを示す。分子量は、右に示される。図2Bは、推定結合部位に結合されたCul3のN末端ドメイン(白)を有するLZTR-1のKelch(緑；リボンダイアグラムの左側の白黒画像におけるグレー)、BTB(シアン；(リボンダイアグラムの中央及び右側の白黒画像におけるライトグレー)及びBACK(紫；リボンダイアグラムの中央及び右側の白黒画像におけるダークグレー)ドメインの相同性モデルを示す。GBM変異は、赤で示される(白黒画像におけるダークグレー；リボンダイアグラムの左側)。

【図2C】Kelchの - プロペラドメイン由来の6つのブレードの配列アラインメント。各ブレードは、a、b、c、dで標識された4つのコア スtrandを含む。保存残余はグレーでハイライトされ、GBMで変異された残余は赤で示される。ブレード5及び6の端部の挿入は、ブラケットで示される。この図面は、配列番号8478を開示している。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

【図6】図6は、全てのエキソームデータからの置換の分布を示す。

【図7】図7は、変異部位におけるジヌクレオチド分布を示す。

【図8】選択されたLZTR-1オルソログの配列アラインメント。GBMで検出された変異は、整列された配列の上に赤で示される。LZTR-1遺伝子は、最も古代に生存する後生動物系統¹⁷として遺伝子的に認識される、海綿Amphimedon queenslandicaを含む、最も後生の動物に存在する。LZTR-1は、また、Capaspora owczarzaki(図面に含まれる)を含むいくつかの近後生動物単細胞の原生生物、及び襟鞭毛虫のSalpingoeca rosetta及びMonosiga brevicollisに存在する。これらのオピストコンタは、動物における多細胞性、分化、及び細胞間の連絡の研究の発展のために重要な生物であり、癌¹⁸における分子経路の役割の理解を補助する。BTB-BACK-Kelchタンパク質⁸とは異なり、LZTR-1は、特徴的なKelch-BTB-BACK-BTB-BACKドメイン構造を有し、その外観から、もしあっても、LZTR-1遺伝子の重複がほとんどない。その名前に関わらず、LZTR-1はロイシンジッパー領域を含まない。この図面は、上から順に配列番号8479から8482をそれぞれ開示している。

【図9】BTB-BACKドメインの配列アラインメント。LZTR-1の2つのBTB-BACKドメインは、HHpred⁶からの予測される二次構造とともに含まれる。3-boxは、BACKドメイン内のCul3結合エレメントである。KLHL3(PDB ID 4HXI)、KLHL11(PDB ID 4AP2)及びGigaxonin(PDB ID 3HVE)の二次構造は、結晶構造に基づく。SPOPの二次構造は、BTB並びにBACKドメインの残りからの3-box領域(PDB ID 3HTM)

及びHHpred予測についての結晶構造に基づく。SPOP及びLZTR-1がBACKドメインの切断されたバージョンを含むため、KLHL3、KLHL11、及びGigaxoninからのBACKドメインの半分のN末端のみが含まれる。この図面は、上から順に配列番号8483から8488をそれぞれ開示している。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0046】

【図12A】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別されるNFASC-NTRK1遺伝子融合。分裂の読み取りは限界点での整列で示される。限界点での予測されるリーディングフレームは、青でNFASC配列（白黒画像におけるグレー；「RVQ...GED」アミノ酸及び「AGA...ATT」ヌクレオチドを包含する）及び赤でNTRK1（白黒画像におけるライトグレー；「YTN...VGL」アミノ酸及び「AGA...AAG」ヌクレオチドを包含する）により上に示される。この図面は、配列番号8489および8490を開示している。

【図12B】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別されるNFASC-NTRK1遺伝子融合。（左のパネル）、GBM由来のcDNAによるNFASC-NTRK1特異的PCR。マーカー、1kbラダー（右のパネル）、限界点でのリーディングフレーム（配列番号8491）を示すサンガーシーケンシングクロマトグラム及び陽性サンプルにおける融合タンパク質の推定上の翻訳（配列番号8492）。

【図12C】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別されるNFASC-NTRK1遺伝子融合。NFASC-NTRK1融合タンパク質配列（配列番号8493）及び概略図。NFASC及びNTRK1に対応する領域が青で（白黒画像におけるグレー；「MAR...GED」アミノ酸を含む配列）及び赤で（白黒画像におけるライトグレー；「YTN...VLG」アミノ酸を含む配列）それぞれ示される。融合は、neurofascinの5つのフィブロネクチン-タイプIIドメインのうち2つ及びNTRK1のプロテインキナーゼドメインを含む。

【図12D】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別されるNFASC-NTRK1遺伝子融合。NFASCイントロン9とNTRK1のイントロン21とのゲノムの融合。融合mRNAにおいて、NFASCのエクソン21は、NTRK1のエクソン10に対して5'をスプライスされる。実線の矢印は、GBMサンプルTCGA-06-5411において融合特異的なPCR産物を生成する融合ゲノムプライマーの位置を示す。

【図13】RNA配列データから読み取られた深さにより測定される発現を示す。融合事象に関係される遺伝子の領域における非常に高いレベルの発現に留意する。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0047

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0047】

【図14A】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別されるCAND1-EGFR遺伝子融合。分裂の読み取りは限界点での整列で示される。限界点での予測されるリーディングフレームは、青でCAND1配列（白黒画像におけるグレー；配列番号13の「TSA...LSR」アミノ酸及び配列番号14の「TTA...CAG」ヌクレオチドを含む配列）及び赤でEGFR（白黒画像におけるライトグレー；配列番号13の「CTG...VGX」アミノ酸及び配列番号14の「ATC...GGC」ヌクレオチドを含む配列）により上に示される。アミノ酸配列（上）は配列番号13；ヌクレオチド配列（下）は配列番号14である。

【図 1 4 B】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別される C A N D 1 - E G F R 遺伝子融合。(左のパネル)、G B M 由来の c D N A による C A N D 1 - E G F R 特異的 P C R。マーカー、1 k b ラダー(右のパネル)、限界点でのリーディングフレーム(配列番号 1 5)を示すサンガーシーケンシングクロマトグラム及び陽性サンプルにおける融合タンパク質(配列番号 1 6)の推定上の翻訳(ボックス配列)。この図面は、配列番号 8 4 9 4 も開示している。

【図 1 4 C】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別される C A N D 1 - E G F R 遺伝子融合。C A N D 1 - E G F R 融合タンパク質配列(配列番号 8 4 9 5)。C A N D 1 及び E G F R に対応する領域は、青(白黒画像におけるグレー; 配列番号 8 4 9 5 の「M A S ... L S R」アミノ酸を含む配列)及び赤(白黒画像におけるグレー; 配列番号 8 4 9 5 の「C T G ... I G A *」アミノ酸を含む配列)でそれぞれ示される。

【図 1 4 D】トランスクリプトームシーケンシング全体により識別される C A N D 1 - E G F R 遺伝子融合。C A N D 1 イントロン 4 と E G F R のイントロン 1 5 とのゲノムの融合。融合 m R N A において、C A N D 1 のエクソン 4 は、E G F R のエクソン 1 6 に対して 5' をスプライスされる。

【図 1 5】野生型及び変異体 L Z T R - 1 のタンパク質安定性と C u l 3 との相互作用を示すプロットの写真画像である。M y c - L Z T R - 1 及び F l a g - C u l 3 を発現するベクターまたは空のベクターにより遺伝子導入された S F 1 8 8 神経膠腫細胞由来のライセートが、F l a g 抗体により免疫沈降され、示される抗体を用いるウエスタンブロットによりアッセイされた。*、非特異的バンド; 矢印の先端は N E D D 化された C u l 3 を示す。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 2】

タンパク質は核酸(たとえば、ゲノム D N A、相補性 D N A (c D N A)、合成 D N A、と同様に相当する R N A の任意の形態を含む)によってコードされる。たとえば、それは遺伝子の組換え核酸によってコードされることができる。本発明のタンパク質は種々の供給源から入手することができ、当該技術で既知の種々の技法に従って作出することができる。たとえば、タンパク質をコードする核酸は D N A ライブラリーをスクリーニングすることによってまたは天然の供給源からの増幅によって得ることができる。タンパク質はその断片または一部であることができる。タンパク質をコードする核酸は組換え D N A 技術を介して作出することができ、そのような組換え核酸は化学合成、遺伝子操作、酵素法またはそれらの組み合わせを含む従来の技法によって調製することができる。たとえば、本発明の融合タンパク質は、E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメインを構成的に活性化するポリペプチドに融合される E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメインを含む。たとえば、融合タンパク質は E G F R - S E P T 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 融合タンパク質であることができる。E G F R - S E P T 融合タンパク質の例は E G F R - S E P T 1 4 である。一実施形態では、E G F R - S E P T 1 4 融合ポリペプチドは配列番号 1、3 または 5 で示されるアミノ酸配列を有することができる。E G F R - P S P H 融合タンパク質の例は配列番号 7、9 または 1 1 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。E G F R - C A N D 融合タンパク質の例は E G F R - C A N D 1 である。一実施形態では、E G F R - C A N D 1 融合ポリペプチドは配列番号 1 3、1 6 または 8 4 9 5 で示されるアミノ酸配列を有することができる。

【手続補正 1 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 7

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

本明細書で使用されるとき、「EGFR融合分子」はEGFRタンパク質のチロシンキナーゼドメインを構成的に活性化するポリペプチドに融合されるEGFRタンパク質のチロシンキナーゼドメインを含む融合タンパク質に相当するポリペプチドをコードする核酸であることができる。たとえば、EGFR融合分子には、EGFR-SEPT融合（たとえば、配列番号1、3、または5で示されるアミノ酸配列を含むまたは配列番号2または4で示される核酸配列を含むEGFR-SEPT14融合ポリペプチド）；EGFR-PPSPH融合（たとえば、配列番号7、9、または11で示されるアミノ酸配列を含むまたは配列番号8または10で示される核酸配列を含む）、またはEGFR-CAND融合（たとえば、配列番号13、16または8495で示されるアミノ酸配列を含むまたは配列番号14または15で示される核酸配列を含むEGFR-CAND1融合ポリペプチド）を挙げることができる。たとえば、EGFR融合分子にはGeneBank受入番号NP__005219、NP__958439、NP__958440またはNP__958441に相当するアミノ酸配列を含むEGFR含有の融合を挙げることができる。EGFR融合分子には、表10に載せた遺伝子のいずれか1つによってコードされるタンパク質に融合されるEGFRタンパク質のチロシンキナーゼドメインを挙げることができる。EGFR融合分子には、その断片のような上述の例の変異体を挙げることができる。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

一実施形態では、EGFR融合分子は、たとえば、配列番号2、4、8、10、14または15で示される配列のような、EGFR融合分子をコードする核酸配列によってコードされるタンパク質またはポリペプチドを含む。一部の実施形態では、EGFR融合分子をコードする核酸配列は配列番号2、4、8、10、14または15に対して約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約93%、約95%、約97%、約98%、または約99%同一である。別の実施形態では、ポリペプチドは、たとえば、グリコシル化及び/またはアセチル化及び/または化学反応またはカップリングによって修飾することができる。EGFR融合分子の例は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。一部の実施形態では、ポリペプチドであるEGFR融合分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495に対して約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約93%、約95%、約97%、約98%、または約99%同一である。別の実施形態では、EGFR融合分子はEGFR融合タンパク質の断片であることができる。たとえば、EGFR融合分子は配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495の少なくとも約8の連続するアミノ酸の部分を含むことができる。断片は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495の少なくとも約10のアミノ酸、少なくとも約20のアミノ酸、少なくとも約30のアミノ酸、少なくとも約40のアミノ酸、少なくとも約50のアミノ酸、少なくとも約60のアミノ酸、または少なくとも約75のアミノ酸を含むことができる。断片には、約8～約100のアミノ酸の間の考えられるアミノ酸の長さすべて、たとえば、約10～約100のアミノ酸の間、約15～約100のアミノ酸の間、約20～約100のアミノ酸の間、約35～約100のアミノ酸の間、約40～約100のアミノ酸の間、約50～約100のアミノ酸の間、約70～約100のアミノ酸の間、約75～約100のアミノ酸の間、または約80～約100のアミノ酸の間の長さが含まれる。断片には、約100～800のアミノ酸の間の考えられるアミノ酸の長さすべて、たと

例えば、約 125 ~ 800 のアミノ酸の間、約 150 ~ 800 のアミノ酸の間、約 175 ~ 800 のアミノ酸の間、約 200 ~ 800 のアミノ酸の間、約 225 ~ 800 のアミノ酸の間、約 250 ~ 800 のアミノ酸の間、約 275 ~ 800 のアミノ酸の間、約 300 ~ 800 のアミノ酸の間、約 325 ~ 800 のアミノ酸の間、約 350 ~ 800 のアミノ酸の間、約 375 ~ 800 のアミノ酸の間、約 400 ~ 800 のアミノ酸の間、約 425 ~ 800 のアミノ酸の間、約 450 ~ 800 のアミノ酸の間、約 475 ~ 800 のアミノ酸の間、約 500 ~ 800 のアミノ酸の間、約 525 ~ 800 のアミノ酸の間、約 550 ~ 800 のアミノ酸の間、約 575 ~ 800 のアミノ酸の間、約 600 ~ 800 のアミノ酸の間、約 625 ~ 800 のアミノ酸の間、約 650 ~ 800 のアミノ酸の間、約 675 ~ 800 のアミノ酸の間、約 700 ~ 800 のアミノ酸の間、約 725 ~ 800 のアミノ酸の間、約 750 ~ 800 のアミノ酸の間、または約 775 ~ 800 のアミノ酸の間の長さが含まれる。

【手続補正 19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

任意でポリペプチド断片を別々に合成し、化学法を用いて組み合わせて完全長の分子を作出することができる。たとえば、これらの方法を利用して本発明の融合タンパク質を合成することができる。一実施形態では、本発明の融合タンパク質は E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメインを構成的に活性化するポリペプチドに融合される E G F R タンパク質のチロシンキナーゼドメインを含む。たとえば、融合タンパク質は E G F R - S E P T 融合タンパク質、E G F R - P S P H 融合タンパク質、または E G F R - C A N D 融合タンパク質であることができる。E G F R - S E P T 融合タンパク質の例は E G F R - S E P T 14 である。一実施形態では、E G F R - S E P T 14 融合ポリペプチドは配列番号 1、3 または 5 で示されるアミノ酸配列を有することができる。E G F R - P S P H 融合タンパク質の例は配列番号 7、9 または 11 で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドである。E G F R - C A N D 融合タンパク質の例は E G F R - C A N D 1 である。一実施形態では、E G F R - C A N D 1 融合ポリペプチドは配列番号 13、16 または 8495 で示されるアミノ酸配列を有することができる。

【手続補正 20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0081

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0081】

断片は、たとえば、E G F R 融合タンパク質のようなタンパク質の断片であることができる。たとえば、E G F R 融合の断片は配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 8495 の少なくとも 8 の連続するアミノ酸の部分を含むことができる。断片は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 8495 の少なくとも約 10 の連続するアミノ酸、少なくとも約 20 の連続するアミノ酸、少なくとも約 30 の連続するアミノ酸、少なくとも約 40 の連続するアミノ酸、少なくとも約 50 の連続するアミノ酸、少なくとも約 60 の連続するアミノ酸、少なくとも約 70 の連続するアミノ酸、少なくとも約 75 の連続するアミノ酸、少なくとも約 80 の連続するアミノ酸、少なくとも約 85 の連続するアミノ酸、少なくとも約 90 の連続するアミノ酸、少なくとも約 95 の連続するアミノ酸、少なくとも約 100 の連続するアミノ酸、少なくとも約 200 の連続するアミノ酸、少なくとも約 300 の連続するアミノ酸、少なくとも約 400 の連続するアミノ酸、少なくとも約 500 の連続するアミノ酸、少なくとも約 600 の連続するアミノ酸、少なくとも約 700 の連続するアミノ酸、または少なくとも約 800 の連続するアミノ酸を含むことができる。

ノ酸を含むことができる。断片は、約 8 ～ 約 100 のアミノ酸の間の考えられるアミノ酸の長さすべて、たとえば、約 10 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 15 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 20 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 35 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 40 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 50 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 70 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 75 ～ 約 100 のアミノ酸の間、または約 80 ～ 約 100 のアミノ酸の間の長さを含む。

【手続補正 21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

たとえば、EGFR 融合ポリペプチドは配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 8495 の少なくとも約 8 の連続するアミノ酸の部分を包含することができる。断片は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、16 または 8495 の少なくとも約 10 の連続するアミノ酸、少なくとも約 20 の連続するアミノ酸、少なくとも約 30 の連続するアミノ酸、少なくとも約 40 の連続するアミノ酸、少なくとも約 50 の連続するアミノ酸、少なくとも約 60 の連続するアミノ酸、少なくとも約 70 の連続するアミノ酸、少なくとも約 75 の連続するアミノ酸、少なくとも約 80 の連続するアミノ酸、少なくとも約 85 の連続するアミノ酸、少なくとも約 90 の連続するアミノ酸、少なくとも約 95 の連続するアミノ酸、少なくとも約 100 の連続するアミノ酸、少なくとも約 200 の連続するアミノ酸、少なくとも約 300 の連続するアミノ酸、少なくとも約 400 の連続するアミノ酸、少なくとも約 500 の連続するアミノ酸、少なくとも約 600 の連続するアミノ酸、少なくとも約 700 の連続するアミノ酸、または少なくとも約 800 の連続するアミノ酸を含むことができる。断片は、約 8 ～ 約 100 のアミノ酸の間の考えられるアミノ酸の長さすべて、たとえば、約 10 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 15 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 20 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 35 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 40 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 50 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 70 ～ 約 100 のアミノ酸の間、約 75 ～ 約 100 のアミノ酸の間、または約 80 ～ 約 100 のアミノ酸の間の長さを含む。これらのペプチド断片は商業的に得ることができ、または液相合成法若しくは固相合成法を介して合成することができる (Atherton ら, (1989)、Solid Phase Peptide Synthesis: a Practical Approach, IRL Press, Oxford, England)。EGFR 融合ペプチド断片は、天然の供給源から単離することができ、遺伝子操作することができ、または化学的に調製することができる。これらの方法は当該技術で周知である。

【手続補正 22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0100

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0100】

EGFR 融合分子阻害剤は、EGFR 融合分子に対して向けられた抗体 (モノクローナル、ポリクローナル、ヒト化、キメラまたは完全にヒトの) またはその結合断片のようなタンパク質であることができる。抗体断片は、完全長形態以外の抗体の形態であることができ、それには、操作されている抗体断片に加えて、完全長の抗体の範囲内に存在する部分及び成分が挙げられる。抗体断片には、単鎖 Fv (scFv)、二重特異性抗体、Fv、及び (Fab')₂、三重特異性抗体、Fc、Fab、CDR1、CDR2、CDR3、CDR の組み合わせ、可変領域、四重特異性抗体、二官能性ハイブリッド抗体、フレームワーク領域、定常領域等を挙げることができるが、これらに限定されない (Maynard ら, (2000)、Ann. Rev. Biomed. Eng. 2: 339 - 76; H

udson (1998)、Curr. Opin. Biotechnol. 9: 395 - 402を参照のこと)。抗体は、商業的に得ることができ、特別注文で生成することができ、または当該技術で確立された方法に従って当該抗原に対して合成することができる（それぞれその全体が参照によって本明細書に組み入れられる米国特許第6,914,128号、米国特許第5,780,597号、及び米国特許第5,811,523号；Roland、E. Kontermann及びStefan Duebel（編者）、Antibody Engineering, 第I及びII巻, (2010)第2版, Springer；Antony S. Dimitrov（編者）、Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), (2009), Humana Press；Benny Lo（編者）、Antibody Engineering: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology), (2004)、Humana Pressを参照のこと)。たとえば、EGFR融合分子に向けた抗体は、Abcam、Santa Cruz Biotechnology、Abgent、R&D Systems、Novus Biologicals等から商業的に入手することができる。EGFR融合分子に向けたヒト抗体（たとえば、モノクローナル抗体、ヒト化抗体、完全にヒト抗体またはキメラ抗体）はヒトにおいて使用するための有用な抗体療法であることができる。一実施形態では、抗体またはその結合断片は配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495に対して向けられる。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0106

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0106】

一実施形態では、EGFR融合分子を含むヒト核酸配列に向けられるsiRNAは配列番号2、4、8、10、14または15のいずれか1つに対して生成することができる。別の実施形態では、EGFR融合分子の切断点を含むヒト核酸配列に向けられるsiRNAは配列番号4、10または15のいずれか1つに対して生成することができる。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0116

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0116】

請求される方法のそれぞれにおける投与工程は、たとえば、EGFR融合分子阻害剤（たとえば、EGFR-SEPT融合タンパク質、EGFR-PSPH融合タンパク質、EGFR-CAND融合タンパク質またはそれらの断片に特異的に結合する抗体を含む医薬組成物；EGFRタンパク質に特異的に結合する小分子；EGFR-SEPT融合タンパク質、EGFR-PSPH融合タンパク質、EGFR-CAND融合タンパク質の発現を低下させるアンチセンスRNAまたはアンチセンスDNA；EGFR-SEPT融合遺伝子、EGFR-PSPH融合遺伝子、EGFR-CAND融合遺伝子の特異的に標的とするsiRNA）のような薬剤の投与を含むことができる。一実施形態では、投与される治療分子は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495のアミノ酸配列の少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約93%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%を含み、そのようなタンパク質の発現を低下させる機能を呈するので、遺伝子融合に関連する癌を治療するEGFR融合分子のポリペプチドを含む。別の実施形態では、治療分子の投与は、多形膠芽腫、乳癌、肺癌、前立腺癌

、または結腸直腸癌に関連する固形腫瘍のサイズを低下させる。さらなる実施形態では、治療分子の投与は、遺伝子融合に関連する癌を患う対象にて細胞増殖を低下させる。

【手続補正 25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

別の実施形態では、投与される治療分子はEGFR融合分子を含むヒトの核酸配列に向けられたsiRNAを含む。一実施形態では、siRNAは配列番号2、4、8、10、14または15のいずれか1つに向けられる。さらなる実施形態では、投与される治療分子は配列番号1、3、5、7、9、11、13、16または8495に対して向けられる抗体またはその結合断片を含む。一部の実施形態では、投与される治療分子は、たとえば、AZD4547、NVP-BGJ398、PD173074、NF449、TK1258、BIBF-1120、BMS-582664、AZD-2171、TSU68、AB1010、AP24534、E-7080、またはLY2874455のようなEGFRタンパク質に特異的に結合する小分子を含む。

【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0122

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0122】

さらなる実施形態では、方法は、たとえば、EGFR-SEPT融合（たとえば、EGFR-SEPT14融合）、EGFR-CAND融合（たとえば、EGFR-CAND1融合）、またはEGFR-PSPH融合のようなEGFR融合分子の存在または発現を検出することを含むことができる。変化したポリペプチドの発現には、変化したポリペプチド配列の存在、変化した量のポリペプチドの存在、または変化した組織分布の存在が挙げられる。これらは、配列決定及び/または特定のリガンド（たとえば、抗体）への結合を含む当該技術で既知の種々の技法によって検出することができる。一実施形態では、検出することは、ノーザンブロット；リアルタイムPCR及び配列番号2、4、8、10、14若しくは15に向けられたプライマー；リボヌクレアーゼ保護アッセイ；ハイブリダイゼーション、増幅、または配列番号2、4、8、10、14若しくは15を含むもののようなEGFR融合分子を検出するための配列決定法；またはそれらの組み合わせを使用することを含む。別の実施形態では、PCRプライマーは配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88または89を含む。さらなる実施形態では、EGFR融合分子のスクリーニングに使用されるプライマーは配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88または89を含む。一部の実施形態では、EGFR融合のゲノム検出に使用されるプライマーは配列番号40、41、42、43、44、45または89を含む。

【手続補正 27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0125

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0125】

ハイブリダイゼーション：

ハイブリダイゼーションの検出方法は、核酸配列の変化を検出するのに役立つ相補性の核酸配列間の特異的なハイブリッドの形成に基づく。検出法には、野生型または変化した

遺伝子若しくはRNAに特異的な核酸プローブの使用、その後のハイブリッドの存在の検出が関与する。プローブは懸濁液中にあることができ、または基材若しくは支持体（たとえば、核酸のアレイまたはチップの技法）の上に不動化することができる。プローブを標識してハイブリッドの検出を円滑にすることができる。一実施形態では、本発明に係るプローブは配列番号2、4、8、10、14または15に向けられた核酸を含むことができる。たとえば、対象に由来する試料を、EGFR融合分子をコードする遺伝子に特異的な核酸プローブに接触させ、その後、ハイブリッドの形成を評価することができる。一実施形態では、方法は試料をEGFR融合分子に特異的であるプローブのセットに同時に接触させることを含む。また、種々の対象に由来する種々の試料を並行して調べることもできる。

【手続補正28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0130

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0130】

増幅：

増幅は、核酸の複製を開始するのに役立つ相補性の核酸配列間で特定のハイブリッドを形成することに基づく。たとえば、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）、リガーゼ鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）及び核酸配列に基づく増幅（NASBA）のような当該技術で既知の種々の技法に従って増幅を行うことができる。市販の試薬及びプロトコルを用いてこれらの技法を実施することができる。当該技術で有用な技法は、リアルタイムPCR、対立遺伝子特異的なPCR、またはPCRに基づく一本鎖立体構造多形（SSCP）を包含する。増幅は普通、反応を開始するのに特定の核酸プライマーの使用を必要とする。たとえば、EGFR融合分子に相当する配列を増幅するのに有用な核酸プライマーは遺伝子座の標的領域に隣接する遺伝子の遺伝子座の部分と特異的にハイブリダイゼーションすることができる。一実施形態では、増幅は配列番号2、4、8、10、14若しくは15に向けられた順行及び逆行のPCRプライマーを使用することを含む。EGFR融合分子に由来する配列を増幅するのに有用な核酸プライマー；プライマーはEGFR融合分子の一部と特異的にハイブリダイゼーションする。特定の対象では、EGFR融合分子の存在は遺伝子融合に関連する癌の対象に対応する。一実施形態では、増幅は配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88または89のヌクレオチド配列を含む順行及び逆行のPCRプライマーを使用することを含むことができる。

【手続補正29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0132

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0132】

本発明は核酸プライマーを提供し、その際、プライマーは遺伝子融合に関連する癌を有する特定の対象にて、たとえば、核酸（たとえば、DNAまたはRNA）のようなEGFR融合分子の一部に対して相補性であり、それと特異的にハイブリダイゼーションすることができる。一実施形態では、遺伝子融合に関連する癌は、多形膠芽腫、乳癌、肺癌、前立腺癌、または結腸直腸癌を含む。本発明のプライマーは、EGFR-SEPT融合（たとえば、EGFR-SEPT14融合）、EGFR-CAND融合（たとえば、EGFR-CAND1融合）、またはEGFR-PSPH融合をコードする核酸（DNAまたはRNA）における融合配列に特異的であることができる。そのようなプライマーを使用することによって、増幅産物の検出はEGFR-SEPT融合（たとえば、EGFR-SEPT14融合）、EGFR-CAND融合（たとえば、EGFR-CAND1融合）、また

はEGFR-PSPH融合をコードする核酸の融合の存在を示す。本発明のプライマーの例は長さ約5～60ヌクレオチド、または長さ約8～約25ヌクレオチドの一本鎖核酸分子であることができる。配列は、EGFR融合分子、たとえば、EGFR-SEPT融合（たとえば、EGFR-SEPT14融合）、EGFR-CAND融合（たとえば、EGFR-CAND1融合）、またはEGFR-PSPH融合をコードする核酸の配列に直接由来することができる。完全な相補性は高い特異性を確保するのに有用ではあるが、特定のミスマッチは認容することができる。たとえば、上記で記載されるような核酸プライマーまたは核酸プライマーの対は、対象にて遺伝子融合に関連する癌の存在を検出する方法で 사용할 ことができる。一実施形態では、たとえば、配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88もしくは89またはそれらの組み合わせを含むプライマーのようなプライマーを用いてEGFR融合分子を検出することができる。

【手続補正30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0135

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0135】

本発明はまた、対象に由来する試料にてEGFR融合分子の存在を検出するための製品及び試薬を含む診断用キットも提供する。キットは、対象に由来する試料がEGFR融合分子の低下した発現を呈するかどうかを測定するのに有用であることができる。たとえば、本発明に係る診断用キットは、プライマー、プライマーの対、核酸プローブ及び/またはリガンド、またはEGFR融合分子に特異的に向けられた抗体を含む。本発明に係る診断用キットはさらに、ハイブリダイゼーション、増幅、または抗原/抗体免疫反応を行うための試薬及び/またはプロトコールを含むことができる。一実施形態では、キットは、配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88もしくは89またはそれらの組み合わせを含むEGFR融合分子と特異的にハイブリダイゼーションし、それに由来するポリメラーゼ反応を刺激することができる核酸プライマーを含むことができる。一実施形態では、たとえば、配列番号32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、87、88もしくは89またはそれらの組み合わせを含むプライマーのようなプライマーを用いてEGFR融合分子を検出することができる。さらなる実施形態では、EGFR融合分子をスクリーニングするのに使用されるプライマー。