

(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2008-535477

(P2008-535477A)

(43) 公表日 平成20年9月4日(2008.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/71 (2006.01)	C O 7 K 14/71	4 B O 2 9
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-557212 (P2007-557212)
 (86) (22) 出願日 平成18年2月23日 (2006.2.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月17日 (2007.10.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/006751
 (87) 国際公開番号 W02006/091899
 (87) 国際公開日 平成18年8月31日 (2006.8.31)
 (31) 優先権主張番号 60/656,263
 (32) 優先日 平成17年2月24日 (2005.2.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 500049716
 アムジエン・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・913
 20-1789、サウザンド・オークス、
 ワン・アムジエン・センター・ドライブ (番地なし)
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100140523
 弁理士 渡邊 千尋
 (74) 代理人 100119253
 弁理士 金山 賢教

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 上皮成長因子受容体変異

(57) 【要約】

上皮成長因子受容体 (E G F r)、ホスファチジルイノシトール 3' - キナーゼ (" P I 3 K ") 及び B - R a f の変異が記載されている。E G F r に対するヒトモノクローナル抗体を用いて、変異された E G F r を含有する腫瘍を治療する方法が記載されている。試料中の 1 つ又はそれ以上の、変異体 E G F r、変異体 P I 3 K 及び / 又は変異体 B - R a f の存在を確認するための方法及びキット並びに変異体 E G F r、変異体 P I 3 K 及び / 又は変異体 B - R a f の存在に関連する疾患又は症状を治療するための方法及びキットも記載されている。変異体 E G F r、変異体 P I 3 K 及び / 又は変異体 B - R a f を含有する腫瘍を治療する方法も記載されている。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 2】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 3】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 4】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 5】

配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 6】

配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 7】

配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 8】

配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチド。

【請求項 10】

配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 11】

配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 12】

配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 13】

請求項 3、4、7、8、11 及び 12 の何れかの少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 14】

請求項 13 のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 15】

請求項 3、4、7、8、11 及び 12 の何れかの単離されたポリヌクレオチドで形質転換された細胞。

【請求項 16】

ポリペプチド産生に対して効果的な条件下で、請求項 14 の宿主細胞を培養することを含む、ポリペプチドを調製する方法。

【請求項 17】

ポリペプチドを単離することをさらに含む、請求項 16 の方法。

【請求項 18】

ポリペプチド産生に対して効果的な条件下で、請求項 15 の細胞を培養することを含む、ポリペプチドを調製する方法。

【請求項 19】

ポリペプチドを単離することをさらに含む、請求項 18 の方法。

【請求項 20】

請求項 16 の方法によって調製されたポリペプチド。

【請求項 21】

請求項 18 の方法によって調製されたポリペプチド。

【請求項 22】

異種ポリペプチドに融合された請求項 1、2、5、6、9 及び 10 の何れかの単離されたポリペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 23】

請求項 1、2、5、6、9 及び 10 の何れかの単離されたポリペプチドに結合することができる特異的結合因子。

【請求項 24】

抗体、重鎖及び軽鎖がリンカーによって接続されている抗体、一本鎖 Fv 抗体、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR グラフト化抗体並びに配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドへの EGF の結合を阻害する抗体から選択される少なくとも 1 つの分子から選択される、請求項 23 の特異的結合剤。

【請求項 25】

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つの配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを動物に投与すること、並びに

配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドに結合できる抗体を前記動物から取得すること、

を含む、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを結合できる抗体を取得する方法。

【請求項 26】

請求項 3、4、7、8、11 及び 12 の何れかのポリヌクレオチドを含むトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 27】

固相支持体に付着された、請求項 3、4、7、8、11 及び 12 の何れかのポリヌクレオチド。

【請求項 28】

固相支持体に付着された、請求項 1、2、5、6、9 及び 10 の何れかのポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 29】

請求項 3、4、7、8、11 及び 12 の何れかの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのアレイ。

【請求項 30】

請求項 1、2、5、6、9 及び 10 の何れかの少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのアレイ。

【請求項 31】

L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異を含む、変異体 R G F r ポリヌクレオチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するか、又は前記ポリヌクレオチドの相補物にハイブリッド形成する核酸プローブ。

10

【請求項 32】

(a) 対象から得られた試料中での、請求項 1 及び 2 の何れかのポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに

(b) 前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む、

対象中の 1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法。

【請求項 33】

(a) 試料中での、請求項 1 及び 2 の何れかのポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに

20

(b) 前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連した疾病又は症状に対する感受性を診断することを含む、

対象中の 1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対する感受性を診断する方法。

【請求項 34】

(a) 変異体 E G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること(前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異を含む。)並びに、

30

(b) 前記試料中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む、

試料中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法。

【請求項 35】

(a) 変異体 E G F r ポリヌクレオチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること(前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異をコードする。)並びに、

40

(b) 前記試料中の変異体 E G F r 変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む、

試料中の変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定する方法。

【請求項 36】

対象中の E G F r 関連癌を診断する方法であり、前記対象から得た試料中における、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含む少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含み、前記少なくとも変異体 E G F r ポリペプチドの存在が

50

前記対象中の E G F 関連癌を診断する、前記方法。

【請求項 37】

対象中の E G F r 関連癌を診断する方法であり、前記対象から得た試料中における、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含むポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含み、前記少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリヌクレオチドの存在が前記対象中の E G F 関連癌を診断する、前記方法。

【請求項 38】

対象中の E G F r 関連癌の発生の可能性を決定する方法であり、前記対象から得た試料中における、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含む少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含み、前記少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリペプチドの存在が前記対象中の E G F r 関連癌の発生の可能性を示す、前記方法。

【請求項 39】

対象中の E G F r 関連癌の発生の可能性を決定する方法であり、前記対象から得た試料中における、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含むポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含み、前記少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリヌクレオチドの存在が前記対象中の E G F 関連癌の発生の可能性を示す、前記方法。

【請求項 40】

E G F r 関連癌が非小細胞肺癌である、請求項 36、37、38 及び 39 の何れかの方法。

【請求項 41】

(a) 請求項 14 又は 15 の何れかの細胞を検査化合物と接触させること、及び
(b) 前記検査化合物が変異体 E G F r ポリペプチドの活性を調節するかどうかを検出すること、
を含む、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含む少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリペプチドの活性の調節物質に対するスクリーニングの方法。

【請求項 42】

請求項 41 の方法によって同定された化合物。

【請求項 43】

少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対する治療を必要とする対象に、請求項 42 の化合物を投与することを含む、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を治療する方法。

【請求項 44】

(a) 対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも 1 つの E G F r 変異を検出すること (少なくとも 1 つの E G F r 変異の検出は、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を発症することに対して、患者が増加した感受性を有することを示す。)

、

(b) 変異体 E G F r ポリペプチドを特異的に結合する抗体を前記対象に投与することを含む、

10

20

30

40

50

少なくとも1つのEGFR変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法。

【請求項45】

(a) 対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも1つのEGFR変異を検出すること(少なくとも1つのEGFR変異の検出は、患者が少なくとも1つのEGFR変異に関連する疾病又は症状を有することを示す。)、及び

(b) 変異体EGFRポリペプチドを特異的に結合する抗体を前記対象に投与することを含む、

少なくとも1つのEGFR変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法。

【請求項46】

抗体がヒト抗体である、請求項44の方法。

10

【請求項47】

抗体がパニツムマブ又はその抗原結合領域である、請求項46の方法。

【請求項48】

EGFR変異の少なくとも1つが、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される、請求項44の方法。

【請求項49】

少なくとも1つのEGFR変異に関連する疾病又は症状が非小細胞肺癌である、請求項44の方法。

【請求項50】

20

少なくとも1つのEGFR変異に関連する疾病又は症状を治療する方法であり、このような治療を必要とする対象に、請求項3及び4の何れかのポリヌクレオチドに対してアンチセンスのポリヌクレオチドを投与することを含む、前記方法。

【請求項51】

(a) 集団中の個体の遺伝的プロファイル中に少なくとも1つのEGFR変異の存在を測定すること、並びに

(b) 変異体EGFR遺伝的プロファイルと前記個体の特異的特徴との間の関係を確定することを含む、

個体の特異的集団において、変異体EGFR集団プロファイルを確定する方法。

【請求項52】

30

個体の特異的特徴が、EGFR変異に関連する疾病又は症状を発症する感受性を含む、請求項51の方法。

【請求項53】

個体の特異的特徴が、EGFR変異に関連する疾病又は症状を呈することを含む、請求項51の方法。

【請求項54】

対象の変異体EGFRポリペプチド中のEGFR変異T790Mの存在又は不存在を測定することを含み、1つ又はそれ以上の変異体EGFRポリペプチド中のEGFR変異T790Mの存在がゲフィチニブを用いた治療に対する耐性を示す、対象中の疾病又は症状に対するゲフィチニブ治療の効力を予測する方法。

40

【請求項55】

対象中のEGFR変異T790Mの存在又は不存在を測定することを含む、癌に罹患する対象中の抗EGFR抗体を用いた治療に対する応答性を測定する方法。

【請求項56】

抗体がパニツムマブ又はセツキシマブである、請求項55の方法。

【請求項57】

変異体EGFRポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブを含む(前記領域は、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つのEGFR変異を含む。)、

50

対象中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するためのキット。

【請求項 5 8】

2 つ又はそれ以上の増幅プライマーをさらに含む、請求項 5 7 のキット。

【請求項 5 9】

検出部分をさらに含む、請求項 5 7 のキット。

【請求項 6 0】

核酸試料採取要素をさらに含む、請求項 5 7 のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

分野

本願は、上皮成長因子受容体（「E G F r」）変異、変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、これらのポリヌクレオチドを発現する細胞及びこれらのポリペプチドに結合する抗体に関する。本願は、ホスファチジルイノシトール 3'-キナーゼ（「P I 3 K」）変異、変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、これらのポリヌクレオチドを発現する細胞及びこれらのポリペプチドに結合する抗体にも関する。本願は、B - R a f 変異、変異体 B - R a f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、これらのポリヌクレオチドを含有するベクター、これらのポリヌクレオチドを発現する細胞及びこれらのポリペプチドに結合する抗体にも関する。本願は、癌を診断する方法、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド又は変異体 B - R a f ポリペプチドと反応する化合物を用いて癌を治療する方法、並びに腫瘍の治療における、抗 E G F r 特異的結合因子、抗 P I 3 K 特異的結合因子又は抗 B - R a f 特異的結合因子の有用性を予測するための方法及びキットにも関する。

20

【背景技術】

【0 0 0 2】

癌治療におけるモノクローナル抗体の特定の適用は、抗体が免疫増強イソタイプ、トキシン又は薬物などの細胞毒性エフェクター機能を癌性組織へ特異的に送達する能力に依存している。別のアプローチは、成長因子の細胞受容体を通じ、成長因子によって媒介されるものなどの不可欠な細胞外増殖シグナルを腫瘍細胞から奪うことによって、腫瘍細胞の生存に直接影響を与えるためにモノクローナル抗体を使用することである。本アプローチにおける魅力的な標的の 1 つは、E G F 及び形質転換成長因子 α (T G F α) を結合する上皮成長因子受容体 (E G F r) である (例えば、U l l r i c h e t a l . , C e l l 61 : 203 - 212 , 1990 ; B a s e l g a e t a l . , P h a r m a c o l . T h e r . 64 : 127 - 154 , 1994 ; M e n d e l s o h n e t a l . , i n B i o l o g i c T h e r a p y o f C a n c e r 607 - 623 , P h i l a d e l p h i a : J . B . L i p p i n c o t t C o . , 1995 ; F a n e t a l . , C u r r . O p i n . O n c o l . 10 : 67 - 73 , 1998 参照)。E G F 又は T G F α の E G F r (170 k D a の膜貫通細胞表面糖タンパク質) への結合は、細胞増殖に至る細胞性生化学的現象 (E G F r の自己リン酸化及び内部移行など) のカスケードの引き金を引く (例えば、U l l r i c h e t a l . , C e l l 61 : 203 - 212 , 1990 参照)。

30

40

【0 0 0 3】

幾つかの観察は、E G F r がヒト固形腫瘍の発達及び進行を支えていることを示唆している。E G F - r は、ヒト固形腫瘍の多くの種類上で過剰発現されることが示されている (例えば、M e n d e l s o h n C a n c e r C e l l s 7 : 359 (1989) , M e n d e l s o h n C a n c e r B i o l o g y 1 : 339 - 344 (1990) , M o d j t a h e d i a n d D e a n I n t ' l J . O n c o l o g y 4 : 277 - 296 (1994) を参照。)。例えば、E G F - r 過剰発現は、特定の

50

肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、脳腫瘍、膀胱癌、頭部及び頸部癌、卵巣癌及び前立腺癌中に観察されている（例えば、Modjtahedi and Dean Int'l J.

Oncology 4:277-296 (1994) 参照。)。受容体レベルの増加は、不良な臨床的予後を伴うことが報告されている（例えば、Baselga et al Pharmacol. Ther. 64:127-154, 1994; Mendelsohn et al., Biologic Therapy of Cancer pp.607-623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi et al., Int'l. J. of Oncology 4:277-296, 1994; Gullick, Br. Medical Bulletin, 47:87-98, 1991; Salomon et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19:183-232, 1995 参照）。上皮成長因子 (EGF) 及び形質転換成長因子- α (TGF- α) は何れも、EGF-r に結合し、細胞の増殖及び腫瘍の成長をもたらすことが示されている。多くの事例で、増加された表面 EGF r 発現は、腫瘍細胞による、TGF α 又は EGF の産生を伴い、これらの腫瘍の進行に、自己分泌型成長調節が関与していることを示す（例えば、Baselga et al Pharmacol. Ther. 64:127-154, 1994; Mendelsohn et al., Biologic Therapy of Cancer pp.607-623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995; Modjtahedi et al., Int'l. J. of Oncology 4:277-296, 1994; Salomon et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19:183-232, 1995 参照）。

【0004】

従って、幾つかのグループは、EGF-r を発現又は過剰発現する腫瘍の治療において、EGF、TGF- α 及び EGF-r に対する抗体が有用であり得ることを提案した（例えば、Mendelsohn Cancer Cells 7:359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1:339-344 (1990), Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994), Tosi et al. Int'l J. Cancer 62:643-650 (1995) を参照。)。実際に、EGF 及び TGF- α の、受容体への結合を遮断する抗 EGF-r 抗体が腫瘍細胞増殖を阻害するように見受けられることが示されている。しかしながら、同時に、抗 EGF-r 抗体は、EGF 及び TGF- α 非依存性細胞増殖を阻害しないようである (Modjtahedi and Dean Int'l J. Oncology 4:277-296 (1994))。

【0005】

EGF 及び TGF α の腫瘍細胞への結合を中和することができ、並びにインビトロでリガンド媒介性細胞増殖を阻害することができる、ヒト EGF r に対して特異的なモノクローナル抗体が、マウス及びラットから作製されている（例えば、Baselga et al., Pharmacol. Ther. 64:127-154, 1994; Mendelsohn et al., in Biologic Therapy of Cancer 607-623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995; Fan et al., Curr. Opin. Oncol. 10:67-73, 1998; Modjtahedi et al., Int'l. J. Oncology 4:277-296, 1994 参照）。マウス 108、225（例えば、Aboud-Pirak et al., J. Natl. Cancer Inst. 80:1605-1611, 1988 を参照。）及び 528（例えば、Baselga et al., Pharmacol. Ther. 64:127-154, 1994; Mendelsohn et al., in Biologic Therapy of Cancer 607-623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995）又はラット ICR16、ICR62 及び IC

10

20

30

40

50

R 6 4 (例 え ば 、 M o d j t a j e d i e t a l . , I n t l . J . O n c o l o g y 4 : 2 7 7 - 2 9 6 , 1 9 9 4 ; M o d j t a h e d i e t a l . , B r . J . C a n c e r 6 7 : 2 4 7 - 2 5 3 , 1 9 9 3 ; M o d j t a h e d i e t a l . , B r . J . C a n c e r 6 7 : 2 5 4 - 2 6 1 , 1 9 9 3) モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 な ど の 抗 体 の 幾 つ か が 、 異 種 移 植 マ ウ ス モ デ ル で の 腫 瘍 増 殖 に 影 響 を 与 え る そ れ ら の 能 力 に つ い て 広 く 評 価 さ れ た 。 抗 E G F r モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の 多 く は 、 ヒ ト 腫 瘍 細 胞 と と も に 投 与 さ れ る と 、 胸 腺 除 去 マ ウ ス で の 腫 瘍 形 成 を 予 防 す る 上 で 有 効 で あ っ た (B a s e l g a e t a l P h a r m a c o l . T h e r . 6 4 : 1 2 7 - 1 5 4 , 1 9 9 4 ; M o d j t a h e d i e t a l . , B r . J . C a n c e r 6 7 : 2 5 4 - 2 6 1 , 1 9 9 3) 。 確 立 さ れ た ヒ ト 腫 瘍 異 種 移 植 を 有 す る マ ウ ス 中 に 注 射 さ れ る と 、 マ ウ ス モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 2 2 5 及 び 5 2 8 は 、 部 分 的 な 腫 瘍 の 退 行 を 引 き 起 こ し 、 腫 瘍 の 根 絶 の た め に は 、 ド キ ソ ル ビ シ ン 又 は シ ス プ ラ チ ン な ど の 化 学 療 法 剤 の 同 時 投 与 を 必 要 と し た (B a s e l g a e t a l . P h a r m a c o l . T h e r . 6 4 : 1 2 7 - 1 5 4 , 1 9 9 4 ; M e n d e l s o h n e t a l . , i n B i o l o g i c T h e r a p y o f C a n c e r 6 0 7 - 6 2 3 , P h i l a d e l p h i a : J . B . L i p p i n c o t t C o . , 1 9 9 5 ; F a n e t a l . , C a n c e r R e s . 5 3 : 4 6 3 7 - 4 6 4 2 , 1 9 9 3 ; B a s e l g a e t a l . , J . N a t l . C a n c e r I n s t . 8 5 : 1 3 2 7 - 1 3 3 3 , 1 9 9 3) 。 マ ウ ス 抗 体 可 変 領 域 が ヒ ト 定 常 領 域 に 連 結 さ れ て い る 2 2 5 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 の キ メ ラ バ ー ジ ョ ン (C 2 2 5) は 、 高 用 量 で の み 、 イ ン ビ ボ で 改 善 さ れ た 抗 腫 瘍 活 性 を 示 し た (例 え ば 、 G o l d s t e i n e t a l . , C l i n i c a l C a n c e r R e s . 1 : 1 3 1 1 - 1 3 1 8 , 1 9 9 5 ; P r e w e t t e t a l . , J . I m m u n o t h e r . E m p h a s i s T u m o r I m m u n o l . 1 9 : 4 1 9 - 4 2 7 , 1 9 9 6 参 照) 。 ラ ッ ト I C R 1 6 、 I C R 6 2 及 び I C R 6 4 抗 体 は 、 確 立 さ れ た 腫 瘍 の 退 行 を 引 き 起 こ し た が 、 そ れ ら の 完 全 な 根 絶 は 引 き 起 こ さ な か っ た (M o d j t a h e d i e t a l . , B r . J . C a n c e r 6 7 : 2 5 4 - 2 6 1 , 1 9 9 3) 。 こ れ ら の 結 果 は 、 E G F r 発 現 固 形 腫 瘍 に 対 す る 抗 体 治 療 の 有 望 な 標 的 と し て E G F r を 確 立 し 、 複 数 の ヒ ト 固 形 癌 に お け る C 2 2 5 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 を 用 い た ヒ ト 臨 床 試 験 へ と 結 実 し た (例 え ば 、 B a s e l g a e t a l . P h a r m a c o l . T h e r . 6 4 : 1 2 7 - 1 5 4 , 1 9 9 4 ; M e n d e l s o h n e t a l . , B i o l o g i c T h e r a p y o f C a n c e r p p . 6 0 7 - 6 2 3 , P h i l a d e l p h i a : J . B . L i p p i n c o t t C o . , 1 9 9 5 ; M o d j t a h e d i e t a l . , I n t l . J . o f O n c o l o g y 4 : 2 7 7 - 2 9 6 , 1 9 9 4 参 照) 。

【 0 0 0 6 】

生 物 の 分 野 に お け る 特 定 の 進 歩 は 、 完 全 な ヒ ト 抗 E G F r 抗 体 を 産 生 す る こ と を 可 能 と し た 。 ヒ ト 免 疫 グ ロ ブ リ ン 遺 伝 子 に 対 し て 遺 伝 子 導 入 さ れ た マ ウ ス (X e n o m o u s e ^{T M} 技 術 、 A b g e n i x 、 I n c .) を 用 い て 、 ヒ ト E G F r に 対 し て 特 異 的 な ヒ ト 抗 体 が 開 発 さ れ た (例 え ば 、 M e n d e z , N a t u r e G e n e t i c s , 1 5 : 1 4 6 - 1 5 6 , 1 9 9 7 ; J a k o b o v i t s , A d v a n c e d D r u g D e l i v e r y R e v i e w s , 3 1 (1 - 2) : 3 3 - 4 2 , 1 9 9 8 ; J a k o b o v i t s , E x p e r t O p i n i o n o n I n v e s t i g a t i o n a l D r u g s , 7 (4) : 6 0 7 - 6 1 4 , 1 9 9 8 ; Y a n g e t a l . , C r i t . R e v . O n c o l . H e m a t o l . 3 8 (1) : 1 7 - 2 3 , 2 0 0 1 ; W O 9 8 / 2 4 8 9 3 ; W O 9 8 / 5 0 4 3 3 参 照) 。 こ の よ う な 抗 体 の 1 つ で あ り 、 ヒ ト E G F r に 対 し て 5×10^{-11} M の 親 和 性 を 有 す る ヒ ト I g G 2 モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 で あ る パ ニ ツ ム マ プ は 、 E G F の E G F r へ の 結 合 を 遮 断 す る こ と 、 受 容 体 シ グ ナ ル 伝 達 を 遮 断 す る こ と 、 並 び に イ ン ビ ト ロ で 腫 瘍 細 胞 の 活 性 化 及 び 増 殖 を 阻 害 す る こ と が 示 さ れ て い る (例 え ば 、 W O 9 8 / 5 0 4 3 3 ; 米 国 特 許 第 6 , 2 3 5 , 8 8 3 号 参 照) 。 胸 腺 除 去 マ ウ ス で の 研 究 は 、 パ ニ ツ ム マ プ は イ ン ビ ボ 活 性 も 有 す る こ と を 示 し 、 胸 腺 除 去 マ ウ ス

でのヒト扁平上皮癌 A 4 3 1 異種移植の形成を予防するのみならず、既に確立された巨大な A 4 3 1 腫瘍異種移植を根絶した（例えば、Yang et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38 (1): 17 - 23, 2001 ; Yang et al., Cancer Res. 59 (6): 1236 - 43, 1999 参照）。パニツムマブは、癌の中でも特に、腎臓癌、結腸直腸腺癌、前立腺癌及び非小細胞扁平上皮肺癌の治療について検討されており（例えば、米国特許公開 2004 / 0033543 号参照）、この抗体を用いた臨床試験が進行中である。

【0007】

特定の細胞の種類では、EGFR などの成長因子の結合が、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ（「PI3K」）及び B - Raf の刺激によってアポトーシスを予防する。PI3K の活性化は、分子カスケードの引き金を引き、プログラム化された細胞死を調節する中央経路の下方制御をもたらす（Yao, R., Science 267: 2003 - 2006, 1995）。Raf ファミリーのメンバーも、哺乳動物でのプログラム化された細胞死の制御物質として同定されている（Hunter, Cell 80: 225 - 236, 1995）。Raf ノックアウトでは、B - Raf を欠如するマウスは細胞の生存の擾乱を示したのに対して、Raf - 1 又は A - Raf を欠如するマウスは、このような擾乱を示さず（例えば、Pritchard, Curr. Biol. 6: 614 - 617, 1996 ; Wojnowski, Nat. Genet. 16: 293 - 297, 1997 を参照）、B - Raf が細胞死制御において特異的な機能を有し得ることを示唆している。PI3K 及び B - Raf は何れも、細胞増殖疾患、特に癌において興味深い。

10

20

【発明の開示】

【0008】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドが提供される。

30

【0009】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0010】

特定の実施形態において、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドが提供される。

40

【0011】

特定の実施形態において、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0012】

特定の実施形態において、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1

50

つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなる単離されたポリペプチドが提供される。

【0013】

特定の実施形態において、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0014】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。特定の実施形態において、前記ベクターを含む宿主細胞が提供される。特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドで形質転換された細胞が提供される。

【0015】

特定の実施形態において、ポリペプチドを調製する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、ポリペプチド産生に対して効果的な条件下で、ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞を培養することを含む。特定の実施形態において、本方法は、ポリペプチド産生に対して効果的な条件下で、ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの単離されたポリヌクレオチドを含む細胞を培養することを含む。特定の実施形態において、本方法は、ポリペプチドを単離することをさらに含む。特定の実施形態において、本方法によって調製されたポリペプチドが提供される。

【0016】

特定の実施形態において、異種ポリペプチドに融合された、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを含む融合タンパク質が提供される。

【0017】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドに結合することが可能な特異的結合因子が提供される。特定の実施形態において、特異的結合因子は、抗体、重鎖及び軽鎖がリンカーによって接続されている抗体、一本鎖 Fv 抗体、免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片、Fab 抗体、Fab' 抗体、(Fab')₂ 抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗イディオタイプ抗体、完全ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、CDR グラフト化抗体並びに配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドへの EGF の結合を阻害する抗体から選択される少なくとも 1 つの分子から選択される。

【0018】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つの配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを動物に投与することを含む。特定の実施形態において、本方法は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを結合することが可能な抗体を動物から取得することをさらに含む。

10

【0019】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むトランスジェニック非ヒト動物が提供される。

【0020】

特定の実施形態において、固相支持体に付着された、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドが提供される。特定の実施形態において、固相支持体に付着された、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含むポリペプチドが提供される。

20

【0021】

特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドのアレイが提供される。特定の実施形態において、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む少なくとも 1 つのポリペプチドを含むポリペプチドのアレイが提供される。

30

【0022】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成する核酸プローブが提供される。特定の実施形態において、前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異を含む。特定の実施形態において、核酸プローブは、ポリヌクレオチドの相補物にハイブリッド形成する。

40

【0023】

特定の実施形態において、対象中の 1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の 1 つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対する感受性を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、対象から得られた試料中における、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1

50

0、配列番号12及び配列番号13から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定することを含む。特定の実施形態において、前記方法は、ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFR変異に関連した疾病又は症状を診断することをさらに含む。特定の実施形態において、前記方法は、ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFR変異に関連した疾病又は症状に対する感受性を診断することをさらに含む。

【0024】

特定の実施形態において、試料中の変異体EGFRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、試料中の変異体EGFRポリペプチドの存在又は不存在を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、変異体RGRポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露することを含み、前記領域は、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つのEGFR変異を含む。特定の実施形態において、前記方法は、試料中の変異体EGFRポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することをさらに含む。特定の実施形態において、前記方法は、試料中の変異体EGFR変異体EGFRポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む。

10

【0025】

特定の実施形態において、対象中のEGFR関連癌を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、前記方法は、対象から得た試料中における、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つの変異を含む少なくとも1つの変異体EGFRポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、前記方法は、対象から得た試料中における、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つの変異を含むポリペプチドをコードする少なくとも1つの変異体EGFRポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、少なくとも変異体EGFRポリペプチドの存在は、対象中のEGFR関連癌を診断する。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体EGFRポリヌクレオチドの存在は、対象中のEGFR関連癌を診断する。

20

30

【0026】

特定の実施形態において、対象におけるEGFR関連癌の発症の可能性を決定する方法が提供される。特定の実施形態において、前記方法は、対象から得た試料中における、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つの変異を含む少なくとも1つの変異体EGFRポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、前記方法は、対象から得た試料中における、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つの変異を含むポリペプチドをコードする少なくとも1つの変異体EGFRポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、少なくとも変異体EGFRポリペプチドの存在は、対象におけるEGFR関連癌の発症の可能性を示す。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体EGFRポリペプチドの存在は、対象におけるEGFR関連癌の発症の可能性を示す。

40

【0027】

特定の実施形態において、EGFR関連癌は、非小細胞肺癌である。

【0028】

特定の実施形態において、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ

50

酸 771 と 772 の間のヒスチジン挿入、T 790 M、L 828 停止、Q 849 R、F 910 L 及び V 948 A から選択される少なくとも 1 つの変異を含む少なくとも 1 つの変異体 E G F r ポリペプチドの活性の調節物質に対するスクリーニングの方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、細胞を検査化合物と接触させること、及び検査化合物が変異体 E G F r ポリペプチドの活性を調節するかどうかを検出することを含む。特定の実施形態において、本方法によって同定された化合物が提供される。特定の実施形態において、L 688 P、Q 701 H、K 745 N、C 781 R、アミノ酸 771 と 772 の間のヒスチジン挿入、T 790 M、L 828 停止、Q 849 R、F 910 L 及び V 948 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対する治療を必要としている対象に前記化合物を投与することを含む。

10

【0029】

特定の実施形態において、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも 1 つの E G F r 変異を検出することを含み、ここにおいて、少なくとも 1 つの E G F r 変異の検出は、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を発症することに対して、患者が増加した感受性を有することを示す。特定の実施形態において、本方法は、対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも 1 つの E G F r 変異を検出することを含み、ここにおいて、少なくとも 1 つの E G F r 変異の検出は、患者が少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を有することを示す。特定の実施形態において、本方法は、変異体 E G F r ポリペプチドを特異的に結合する抗体を対象に投与することを含む。特定の実施形態において、抗体はヒト抗体である。特定の実施形態において、抗体はパニツムマブ又はその抗原結合領域である。

20

【0030】

特定の実施形態において、E G F r 変異は、L 688 P、Q 701 H、K 745 N、C 781 R、アミノ酸 771 と 772 の間のヒスチジン挿入、T 790 M、L 828 停止、Q 849 R、F 910 L 及び V 948 A から選択される。

【0031】

特定の実施形態において、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状は非小細胞肺癌である。

30

【0032】

特定の実施形態において、少なくとも 1 つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドに対してアンチセンスであるポリヌクレオチドを、このような治療を必要とする対象に投与することを含む。

【0033】

特定の実施形態において、個体の特異的集団において、変異体 E G F r 集団プロファイルを確定する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、集団中の個体の遺伝的プロファイル中における少なくとも 1 つの E G F r 変異の存在を測定することを含む。特定の実施形態において、本方法は、変異体 E G F r 遺伝的プロファイルと前記個体の特異的特徴との間の関係を確定することをさらに含む。特定の実施形態において、個体の特異的特徴は、E G F r 変異に関連する疾病又は症状を発症することに対する感受性を含む。特定の実施形態において、個体の特異的特徴は、E G F r 変異に関連する疾病又は症状を呈することを含む。

40

【0034】

特定の実施形態において、対象中の疾病又は症状に対するゲフィチニブ治療の有効性を

50

予測する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、対象の変異体 E G F r ポリペプチド中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチド中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在は、ゲフィチニブを用いた治療に対する耐性を示す。

【0035】

特定の実施形態において、癌に罹患している対象における抗 E G F r 抗体を用いた治療に対する応答性を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、本方法は、対象中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在又は不存在を決定することを含む。特定の実施形態において、抗体はパニツムマブ又はセツキシマブである。

【0036】

特定の実施形態において、対象中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するためのキットが提供される。特定の実施形態において、本キットは、変異体 E G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブを含み、前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも1つの E G F r 変異を含む。特定の実施形態において、本キットは、2つ又はそれ以上の増幅プライマーをさらに含む。特定の実施形態において、本キットは、検出成分をさらに含む。特定の実施形態において、本キットは、核酸試料作製要素をさらに含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

本明細書に引用されている全ての参考文献（特許、特許出願、論文、教科書など、及びこれらの中に引用されている参考文献を含む。）は、それらが既に有効でない範囲まで、参照により、その全体が、本明細書に組み込まれる。本明細書に使用されている節の見出しは、整理の目的のためにすぎず、記載されている主題を限定するものと解釈すべきではない。

【0038】

定義

別段の定義がなければ、本発明に関連して使用される科学及び技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈上別段の必要がなければ、単数形用語は複数を含むものとし、複数形用語は単数を含むものとする。

【0039】

一般的に、本明細書に記載されている細胞及び組織培養、分子生物学並びにタンパク質及びオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチド化学及びハイブリッド形成法に関連して使用される命名法及びこれらの技術は、周知のものであり、本分野において一般的に使用されている。組換え DNA、オリゴヌクレオチド合成及び組織培養及び形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）に対しては、標準的な技術が使用される。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様に従って、又は本分野で一般的に遂行されているように、又は本明細書に記載されているように、実施される。一般に、先述の技術及び手順は、本分野で周知の慣用的な方法に従い、並びに本明細書を通じて引用及び論述されている様々な一般的参考文献及びより具体的な参考文献中に記載されているように、実施される。例えば、「Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989))」（参照により、本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学に関して使用される命名法、並びに本明細書に記載されている分析化学、合成有機化学及び医薬品化学及び薬化学の実験室操作及び技術は、周知のものであり、本分野で一般的に使用されているものである。化学合成、化学分析、薬学的な調製、調合及び送達及び患者の治療に対しては、標準的な技術が使用される。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 0 】

本願において、「又は」の使用は、別段の記載がなければ、「及び／又は」を意味する。さらに、「含んでいる」という用語並びに「含む」及び「含まれた」などのその他の形式の使用は、限定的なものではない。また、「要素」又は「成分」などの用語は、別段の記載がなければ、一つのユニットを含む要素及び成分並びに 1 より多いサブユニットを含む要素及び成分を包含する。

【 0 0 4 1 】

本開示に従って使用される場合、以下の用語は、別段の記載がなければ、以下の意味を有するものと理解しなければならない。

【 0 0 4 2 】

本明細書において使用される「単離されたポリヌクレオチド」又は「単離された核酸」という用語は互換的に使用され、ゲノム、cDNA 若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせのポリヌクレオチドを意味し、その起源に基づいて、「単離されたポリヌクレオチド」は、(1)「単離されたポリヌクレオチド」が本来その中で見出されるポリヌクレオチドの全部又は一部を伴っていないか、(2)本来連結されていないポリヌクレオチドに作用可能に連結されているか、又は(3)より大きな配列の一部として本来生じない。

【 0 0 4 3 】

「単離されたタンパク質」及び「単離されたポリペプチド」という用語は、互換的に使用され、本明細書において、その起源又は由来により、(1)本来見出されるタンパク質を伴わないか、(2)同じ起源由来の他のタンパク質が存在しないか(例えば、マウスタンパク質が存在しない。)、(3)異なる種由来の細胞によって発現されているか、又は(4)本来存在しない、cDNA、組み換えRNA 若しくは合成起源又はこれらの幾つかの組み合わせのタンパク質を意味する。

【 0 0 4 4 】

「ポリペプチド」及び「タンパク質」という用語は互換的に使用され、原型タンパク質、断片、ペプチド又はポリペプチド配列の類縁体を表すための包括的な用語として本明細書において使用される。従って、原型タンパク質、断片及び類縁体は、ポリペプチド属の種である。

【 0 0 4 5 】

ポリペプチド配列中の変異に関連する「X#Y」という用語は本分野で認知されており、ここにおいて、「#」はポリペプチドのアミノ酸数に関連する変異の位置を表し、「X」は野生型アミノ酸配列中の位置に見出されるアミノ酸を表し、「Y」はその位置における変異体アミノ酸を表す。例えば、EGFR ポリペプチドに関する「L688P」という表記は、野生型EGFR 配列のアミノ酸数688にロイシンが存在すること、及び変異体EGFR 配列中でロイシンがプロリンで置換されていることを示している。

【 0 0 4 6 】

「変異体EGFR ポリペプチド」及び「変異体EGFR タンパク質」という用語は互換的に使用され、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L 及びV948A から選択される少なくとも1つのEGFR 変異を含むEGFR ポリペプチドを表す。特定の典型的な変異体EGFR ポリペプチドには、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーション、誘導体バリエーション、置換バリエーション、欠失バリエーション及び／又は挿入バリエーション、融合ポリペプチド、相同分子種及び種間相同体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体EGFR ポリペプチドは、リーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基及び／又は融合タンパク質残基などの(これらに限定されない。)C末端又はN末端に追加の残基を含む。

【 0 0 4 7 】

「変異体PI3K ポリペプチド」及び「変異体PI3K タンパク質」という用語は互換的に使用され、E542K、E545A 及びH1047L から選択される少なくとも1つ

10

20

30

40

50

の P I 3 K 変異を含む P I 3 K ポリペプチドを表す。特定の典型的な変異体 P I 3 K ポリペプチドには、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーション、誘導体バリエーション、置換バリエーション、欠失バリエーション及び / 又は挿入バリエーション、融合ポリペプチド、相同分子種及び種間相同体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、リーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基及び / 又は融合タンパク質残基など（これらに限定されない。）

【 0 0 4 8 】

「変異体 B - R a f ポリペプチド」及び「変異体 B - R a f タンパク質」という用語は互換的に使用され、V 6 0 0 E 及び K 6 0 1 E から選択される少なくとも 1 つの B - R a f 変異を含む B - R a f ポリペプチドを表す。特定の典型的な変異体 B - R a f ポリペプチドには、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーション、誘導体バリエーション、置換バリエーション、欠失バリエーション及び / 又は挿入バリエーション、融合ポリペプチド、相同分子種及び種間相同体が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、リーダー配列残基、標的誘導残基、アミノ末端メチオニン残基、リジン残基、タグ残基及び / 又は融合タンパク質残基など（これらに限定されない。）

【 0 0 4 9 】

「変異体 E G F r 融合タンパク質」という用語は、変異体 E G F r ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸（異種ポリペプチドなど）の融合を表す。

【 0 0 5 0 】

「変異体 P I 3 K 融合タンパク質」という用語は、変異体 P I 3 K ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸（異種ポリペプチドなど）の融合を表す。

【 0 0 5 1 】

「変異体 B - R a f 融合タンパク質」という用語は、変異体 B - R a f ポリペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端における 1 つ又はそれ以上のアミノ酸（異種ポリペプチドなど）の融合を表す。

【 0 0 5 2 】

ある対象に対して適用される、本明細書で使用する「天然に存在する」という用語は、目的物を自然に見出すことができるという事実を表す。例えば、自然の取得源から単離することができる生物（ウイルスを含む。）中に存在し、実験室またはその他においてヒトが意図的に修飾を加えていないポリペプチド又はポリヌクレオチド配列は、天然に存在する。

【 0 0 5 3 】

本明細書において使用される「作用可能に連結された」という用語は、成分を所期の様式で機能させることができる関係に成分があるような成分の位置を表す。コード配列に対して「作用可能に連結された」調節配列は、調節配列と適合的な条件下で、コード配列の発現が達成されるように連結されている。

【 0 0 5 4 】

本明細書において使用される「調節配列」という用語は、それらが連結されているコード配列の発現及びプロセッシングを実施するのに必要であるポリヌクレオチド配列を表す。このような調節配列の性質は、宿主生物に応じて異なる。原核生物では、このような調節配列は、一般に、プロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含む。真核生物では、一般に、このような調節配列には、プロモーター及び転写終結配列が含まれる。「調節配列」という用語は、最小限、その存在が発現及びプロセッシングに不可欠である全ての成分を含むものとし、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列及び融合対配列も含むことが可能である。

【 0 0 5 5 】

本明細書において使用される「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも10塩基長のヌクレオチド（リボヌクレオチド若しくはデオキシヌクレオチドの何れかまたはヌクレオチドの何れかのタイプの修飾された形態）のポリマー形態を意味する。本用語は、DNAの一本鎖及び二本鎖形態を含む。

【0056】

本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド」という用語には、天然に存在するオリゴヌクレオチド連結及び天然に存在しないオリゴヌクレオチド連結によって互いに連結された天然に存在するヌクレオチド及び修飾されたヌクレオチドが含まれる。オリゴヌクレオチドは、一般的に、200塩基以下の長さを含むポリヌクレオチドサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、10から60塩基の長さであり、最も好ましくは、12、13、14、15、16、17、18、19又は20ないし40塩基の長さである。オリゴヌクレオチドは、通常、一本鎖であるが（例えば、プローブの場合）、オリゴヌクレオチドは二本鎖であり得る（例えば、遺伝子変異体の構築において使用する場合）。本発明のオリゴヌクレオチドは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドの何れかであり得る。

【0057】

「変異体EGFrポリヌクレオチド」、「変異体EGFrオリゴヌクレオチド」及び「変異体EGFr核酸」という用語は互換的に使用され、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つのEGFr変異を含むEGFrポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを表す。

【0058】

「変異体PI3Kポリヌクレオチド」、「変異体PI3Kオリゴヌクレオチド」及び「変異体PI3K核酸」という用語は互換的に使用され、E542K、E545A及びH1047Lから選択される少なくとも1つのPI3K変異を含むPI3Kポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを表す。

【0059】

「変異体B-Rafポリヌクレオチド」、「変異体B-Rafオリゴヌクレオチド」及び「変異体B-Raf核酸」という用語は互換的に使用され、L688P、Q701H、K745N、C781R、アミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入、T790M、L828停止、Q849R、F910L及びV948Aから選択される少なくとも1つのB-Raf変異を含むB-Rafポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを表す。

【0060】

本明細書において使用される「天然に存在するヌクレオチド」という用語には、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドが含まれる。本明細書において使用される「修飾されたヌクレオチド」という用語には、修飾又は置換された糖基などを有するヌクレオチドが含まれる。本明細書において使用される「オリゴヌクレオチド連結」という用語には、ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート、ホスホロセレノアート、ホスホロジセレノアート、ホスホロアニロチオアート（phosphoroanilothioate）、ホスホランラダート（phosphoraniladate）、ホスホロアミダートなどのオリゴヌクレオチド連結が含まれる。例えば、「LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon et al. Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. 米国特許第5,151,510号; Uhlmann and Peyman Chemical

10

20

30

40

50

Reviews 90:543(1990)」を参照されたい(これらの開示内容は、参照により、本明細書に組み込まれる。)。オリゴヌクレオチドは、所望であれば、検出用の標識を含むことができる。

【0061】

本明細書において使用される「選択的にハイブリッド形成する」という用語は、検出可能に及び特異的に結合することを意味する。ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及びこれらの断片は、非特異的な核酸への検出可能な結合の相当な量を最小限に抑えるハイブリッド形成及び洗浄条件下で、核酸鎖に選択的にハイブリッド形成する。本分野において公知の、及び本明細書に論述されている選択的ハイブリッド形成条件を達成するために、高ストリンジェンシー条件を使用することが可能である。一般的に、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド及び断片と対象核酸配列間の核酸配列相同性は、少なくとも80%、より典型的には、好ましくは、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%及び100%の増加する相同性を有する。それらの配列間に部分的な同一性又は完全な同一性が存在すれば、2つのアミノ酸配列は相同である。例えば、85%の相同性は、2つの配列が最大の一致を有するように並置されたときに、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。合致を最大化する際には、(合致されている2つの配列の何れか中の)ギャップが許容される。5又はそれ以下のギャップ長が好ましく、2又はそれ以下がさらに好ましい。あるいは及び好ましくは、変異データマトリックス及び6又はそれ以上のギャップペナルティーを用いるプログラムALIGNを用いて、2つのタンパク質配列(又は、それらから誘導される少なくとも30アミノ酸の長さのポリペプチド配列)が(標準偏差単位で)6以上のアラインメントスコアを有すれば、本用語が本明細書において使用される場合、それらは相同である。Dayhoff, M.O., in Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volume 5, National Biomedical Research Foundation (1972))及びこの巻に対する補遺2, pp. 1-10を参照されたい。ALIGNプログラムを用いて最適に並置された場合に、2つの配列又はその一部のアミノ酸が50%超又は50%に等しい同一性であれば、2つの配列又はその一部は、より好ましくは相同である。本明細書において「対応する」という用語は、参照ポリヌクレオチド配列の全部若しくは一部に対してポリヌクレオチド配列が相同である(すなわち、厳格に進化的に関連せずに同一である。)こと、又はポリペプチド配列は参照ポリヌクレオチド配列と同一であることを意味するために使用される。これに対して、本明細書において、「に相補的」という用語は、相補的な配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部又は一部に対して相同であることを意味するために使用される。例として、ヌクレオチド配列「TATAC」は参照配列「TATAC」に対応し、参照配列「GTATA」に対して相補的である。

【0062】

以下の用語:「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性のパーセント」及び「実質的な同一性」が、2つ又はそれ以上のポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の間の配列関連性を記載するために使用される。「参照配列」とは、配列比較のための基礎として使用される所定の配列である。参照配列は、例えば、配列表に掲載されている完全長cDNA若しくは遺伝子配列のセグメントとして、より大きな配列のサブセットであり得、又は完全なcDNA若しくは遺伝子配列を含み得る。一般的に、参照配列は、少なくとも18ヌクレオチド又は6アミノ酸長であり、頻繁に、少なくとも24ヌクレオチド又は8アミノ酸長であり、しばしば、少なくとも48ヌクレオチド又は16アミノ酸長である。2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列は、各々、(1)2つの分子間で類似する配列(すなわち、完全なポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の一部)を含んでもよく、及び(2)2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列間で相違する配列をさらに含んでもよく、配列類似性の局所領域を同定及び比較するために、2つ(又はそれ以上の)分子間の配列比較は、典型的には、「比較ウィンドウ」にわたって2つの分子の配列を比較することによって行われる。本明細書において使用される「比較ウィンドウ」は、少な

くとも18の連続するヌクレオチド位置又は6つのアミノ酸の概念的セグメントを表し、ここにおいて、ポリヌクレオチド配列又はアミノ酸配列は、少なくとも18の連続するヌクレオチド又は6つのアミノ酸配列の参照配列と比較することができ、及び比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列の一部は、2つの配列の最適なアラインメントのために、(付加又は欠失を含まない)参照配列と比べて、20パーセント又はそれ以下の付加、欠失、置換など(すなわちギャップ)を含み得る。比較ウィンドウを並置するための配列の最適なアラインメントは、Smith及びWaterman Adv. Appl. Math. 2:482(1981)の局所相同性アルゴリズムによって、Needleman及びWunsch(1970) J. Mol. Biol. 48:443(1970)の相同性アラインメントアルゴリズムによって、Pearson及びLipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444(1998)の類似法の検索によって、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実装(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)、GeneworksまたはMacVector software packagesにおける、GAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA)によって又は目視によって実施することができ、様々な方法によって得られた最高のアラインメント(すなわち、比較ウィンドウにわたって相同性の最高のパーセントをもたらす。)が選択される。

10

20

【0063】

「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウにわたって、2つのポリヌクレオチド又はアミノ酸配列が同一であること(すなわち、ヌクレオチド対ヌクレオチド又は残基対残基ベースで)を意味する。「配列同一性のパーセント」という用語は、比較ウィンドウにわたって最適に並置された2つの配列を比較し、合致した位置の数を得るために、両配列中で、同一の核酸塩基(例えば、A、T、C、G、U又はI)又は残基が生じる位置の数を測定し、合致した位置の数を、比較ウィンドウ中の位置の総数(すなわち、ウィンドウサイズ)によって割り、及び配列同一性のパーセントを得るために、結果に100を乗じることにより計算される。本明細書において使用される「実質的な同一性」という用語は、少なくとも18ヌクレオチド(6アミノ酸)位置の比較ウィンドウにわたって、しばしば、少なくとも24-48ヌクレオチド(8-16アミノ酸)位置のウィンドウにわたって基準配列に対して比較した場合に、ポリヌクレオチド又はアミノ酸が、少なくとも85%の配列同一性、好ましくは少なくとも90~95%の配列同一性、より一般的には、少なくとも96、97、98又は99%の配列同一性を有する配列を含む、ポリヌクレオチド又はアミノ酸配列の特徴を表し、配列同一性のパーセントは、比較ウィンドウにわたって、参照配列の計20%又はそれ以下の欠失又は付加を含み得る配列と参照配列を比較することによって算出される。参照配列は、より大きな配列のサブセットであり得る。

30

【0064】

本明細書において使用される、20の慣用アミノ酸及びそれらの略号は、慣用的な用法に従う。「Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))」(参照により、本明細書に組み込まれる。)を参照されたい。本明細書において使用される「アミノ酸」又は「アミノ酸残基」という用語は、天然に存在するLアミノ酸又はDアミノ酸を表す。アミノ酸に対して一般的に使用される一文字及び三文字の略号が、本明細書において使用される(Bruce Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York (4th ed., 2002))。20の慣用アミノ酸、 α -、 α -二置換されたアミノ酸などの非天然アミノ酸、N-アルキルアミノ酸、乳酸及びその他の非慣用アミノ酸の立体異性体(例えば、D-アミノ酸)も、本発明のポリペプチドに対する適切な成分であり得る。非慣用アミノ酸の例には、4-ヒドロキシプロリン、 γ -カル

40

50

ボキシグルタミン酸、 ϵ -N,N,N-トリメチルリジン、 ϵ -N-アセチルリジン、O-ホスホセリン、N-アセチルセリン、N-ホルミルメチオニン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリジン、 σ -N-メチルアルギニン並びに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば、4-ヒドロキシプロリン）が含まれる。本明細書において使用されるポリペプチドの表記法では、標準的な用法と慣習に従って、左手方向がアミノ末端方向であり、右手方向がカルボキシ末端方向である。

【0065】

同様に、別段の記載がなければ、一本鎖ポリヌクレオチド配列の左手末端は5'末端である。二本鎖ポリヌクレオチド配列の左手方向は、5'方向と称される。新生RNA転写物の、5'から3'への付加の方向は、転写方向と称される。RNAと同じ配列を有し、RNA転写物の5'末端に対して5'である、DNA鎖上の配列領域は、「上流配列」と称される。RNAと同じ配列を有し、RNA転写物の3'末端に対して3'である、DNA鎖上の配列領域は、「下流配列」と称される。

10

【0066】

ポリペプチドに対して適用される場合、「実質的な同一性」という用語は、初期設定ギャップウェイトを用いたプログラムGAP又はBESTFITによるなど、最適に並置された場合に、2つのペプチド配列が、少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%、96%、97又は98%配列同一性、及び最も好ましくは少なくとも99%の配列同一性を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。本明細書において論
述される場合、抗体又は免疫グロブリン分子のアミノ酸配列中の微小な変動が、本発明によ
って包含されるものとして想定されるが、但し、アミノ酸配列中の変動は、少なくとも
75%、より好ましくは少なくとも80%、90%、95%、及び最も好ましくは99%
を維持する。保存的なアミノ酸置換とは、それらの側鎖中において、関連するアミノ酸の
ファミリー内で生じる置換である。遺伝的にコードされるアミノ酸は、一般的に、(1)
酸性=アスパラギン酸、グルタミン酸；(2)塩基性=リジン、アルギニン、ヒスチジン
；(3)非極性=アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラ
ニン、メチオニン、トリプトファン；及び(4)非常電極性=グリシン、アスパラギン、
グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシンというファミリーに分けられる
。より好ましいファミリー：セリン及びスレオニンは、脂肪族-ヒドロキシファミリーで
あり；アスパラギン及びグルタミンはアミド含有ファミリーであり；アラニン、バリン、
ロイシン及びイソロイシンは、脂肪族ファミリーであり；フェニルアラニン、トリプトフ
アン及びチロシンは芳香族ファミリーであり、並びにシステイン及びメチオニンは含硫側
鎖ファミリーである。例えば、ロイシンのイソロイシン又はバリンとの単離された置換、
アスパラギン酸のグルタミン酸との単離された置換、スレオニンのセリンとの単離された
置換、又はあるアミノ酸の構造的に関連したアミノ酸との類似の置換は、特に置換がフレ
ームワーク部位内のアミノ酸を含まなければ、生じた分子の結合又は特性に対して多大な
影響を有しない。好ましい保存的アミノ酸置換基は、バリン-ロイシン-イソロイシン、
フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-
アスパラギン酸、システイン-メチオニン及びアスパラギン-グルタミンである。

20

30

40

【0067】

好ましいアミノ酸置換は、(1)タンパク質分解に対する感受性を低下させる置換、(2)酸化に対する感受性を低下させる置換、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる置換、(4)結合親和性を変化させる置換及び(5)このような類縁体の他の物理化学的又は機能的特性を付与又は修飾する置換である。類縁体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々な変異タンパク質を含み得る。例えば、単一又は複数のアミノ酸置換（好ましくは、保存的アミノ酸置換）は、天然に存在する配列中に（好ましくは、分子間接触を形成するドメイン外のポリペプチドの部分中に）作製し得る。保存的アミノ酸置換は、親配列の構造的特徴を実質的に変化させるべきではない（例えば、置換アミノ酸は、親配列中に生じるヘリックスを破壊する傾向を示すべきではなく、又

50

は親配列を特徴付ける二次構造の他の種類を崩壊させるべきでない。)。本分野で認められたポリペプチド二次構造及び三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 及び Thornton et al., Nature 354:105 (1991) に記載されており、これらは各々、参照により本明細書中に組み込まれる。

【0068】

本明細書において使用される「類縁体」という用語は、天然に存在するポリペプチドのアミノ酸配列の一部に対して実質的な同一性を有する少なくとも25アミノ酸のセグメントから構成され、及び天然に存在するポリペプチドの活性の少なくとも1つを有するポリペプチドを表す。典型的には、ポリペプチド類縁体は、天然に存在する配列に関して保存的なアミノ酸置換(又は付加又は欠失)を含む。類縁体は、典型的には、少なくとも20アミノ酸長、好ましくは少なくとも50アミノ酸長又はそれ以上であり、しばしば、完全長の天然に存在するポリペプチドと同じ長さとするのが可能である。

【0069】

ペプチド類縁体は、一般に、テンプレートペプチドの特性と類似の特性を有する非ペプチド薬として、製薬産業で使用される。非ペプチド化合物のこの種類は、「ペプチド模倣体」と名づけられている。「Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986); Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985); and Evans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)」、これらは参照により、本明細書に組み込まれる。このような化合物は、しばしば、コンピュータ化された分子モデリングの助けを借りて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に類似するペプチド模倣体は、等価な治療効果又は予防効果を生じさせるために使用し得る。一般的に、ペプチド模倣体は、ヒト抗体などの模範ポリペプチド(すなわち、生化学的特性又は薬理学的活性を有するポリペプチド)と構造的に類似するが、本分野で周知の方法によって、- - CH₂NH - -、- - CH₂S - -、- - CH₂-CH₂- -、- - CH=CH - (シス及びトランス)、- - COCH₂- -、- - CH(OH)CH₂- - 及び - - CH₂SO - - からなる群から選択される結合によって必要に応じて置換された1つ又はそれ以上のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の1つ又はそれ以上のアミノ酸を同種のDアミノ酸で体系的に置換すること(例えば、L-リジンに代えてD-リジン)は、より安定なペプチドを作製するために使用し得る。さらに、コンセンサス配列又は実質的に同一なコンセンサス配列変異を含む拘束されたペプチドは、本分野で公知の方法によって、例えば、ペプチドを環状化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって、作製され得る(Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)、参照により、本明細書に組み込まれる。)

【0070】

断片又は類縁体の好ましいアミノ及びカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界付近に生じる。構造的及び機能的ドメインは、ヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データを、公共の配列データベース又は独自の配列データベースと比較することによって同定することが可能である。好ましくは、コンピュータ化された比較法は、公知の構造及び/又は機能の他のタンパク質中に生じる配列モチーフ又は予測されるタンパク質立体構造ドメインを同定するために使用される。公知の三次元構造に折り畳まれるタンパク質配列を同定するための方法は公知である(Bowie et al Science 253:164 (1991)を参照。)。当業者であれば、本発明に従って構造的及び機能的ドメインを定義するために使用され得る配列モチーフ及び構造的立体構造を認めることができる。

【0071】

「特異的結合因子」という用語は、標的に特異的に結合する天然分子又は非天然分子を表す。特異的結合因子の例には、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質及び小分子化合物が含まれるが、これらに限定されるものではない。特定の実施形態において、特異的結合因子は抗体である。特定の実施形態において、特異的結合因子は抗原結合領域である。

【0072】

「変異体 E G F r ポリペプチドに対する特異的結合因子」という用語は、変異体 E G F r ポリペプチドの任意の部分を特異的に結合する特異的結合因子を表す。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドに対する特異的結合因子は、変異体 E G F r ポリペプチドに対する抗体である。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドに対する特異的結合因子は抗原結合領域である。

10

【0073】

「変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する特異的結合因子」という用語は、変異体 P I 3 K ポリペプチドの任意の部分を特異的に結合する特異的結合因子を表す。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する特異的結合因子は、変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する抗体である。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する特異的結合因子は抗原結合領域である。

【0074】

「変異体 - R a f ポリペプチドに対する特異的結合因子」という用語は、変異体 B - R a f ポリペプチドの任意の部分を特異的に結合する特異的結合因子を表す。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドに対する特異的結合因子は、変異体 B - R a f ポリペプチドに対する抗体である。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドに対する特異的結合因子は抗原結合領域である。

20

【0075】

「特異的に結合する」という用語は、特異的結合因子が、非標的への結合に比べて大きな親和性で、標的に結合する能力を表す。特定の実施形態において、特異的結合とは、非標的に対する親和性より少なくとも 10、50、100、250、500 又は 1000 倍大きな親和性での、標的への結合を表す。ある実施形態において、親和性は、アフィニティ E L I S A アッセイによって測定される。ある実施形態において、親和性は、B I A c o r e アッセイによって測定される。特定の実施形態において、親和性は、速度論的な方法によって測定される。特定の実施形態において、親和性は、平衡 / 溶液法によって測定される。特定の実施形態において、抗体とその認識されるエピトープの 1 つ又はそれ以上との間の解離定数が $1 \mu M$ 以下、好ましくは $100 nM$ 以下及び最も好ましくは $10 nM$ 以下である場合に、抗体は、抗原を特異的に結合すると言われる。

30

【0076】

「原型の抗体及び免疫グロブリン」は、通常、2 つの同一の軽 (L) 鎖及び 2 つの同一の重 (H) 鎖から構成される、約 150,000 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖は 1 つの共有ジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、異なる免疫グロブリンイソタイプの重鎖間で、ジスルフィド結合の数は異なる。各重及び軽鎖は、等間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一つの末端に、可変ドメイン (V H) を有し、その後、多数の定常ドメインが続く。各軽鎖は、1 つの末端に可変ドメイン (V L) を有し、及びその他方の末端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の最初の定常ドメインとともに並置され、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと並置される。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインの間にインターフェイスを形成すると考えられている (Chothia et al., J. Mol. Biol. 186:651 (1985); Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:4592 (1985); Chothia et al., Nature 342:877-883 (1989))。

40

【0077】

50

「抗体」という用語は、原型状態の抗体及び特異的結合について、原型状態の抗体と競合するその抗原結合断片の両方を表す。「その抗原結合断片」とは、断片が抗原結合機能を保持している、原型状態の抗体分子の一部又は断片を表す。結合断片は、組換えDNA技術によって、又はパインを用いた切断によるなど、原型状態の抗体の構想的若しくは化学的切断によって産生される。結合断片には、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖抗体(「scFv」)、Fd'及びFd断片が含まれる。モノクローナル抗体から様々な断片を産生する方法は、当業者に周知である(例えば、Pluckthun, 1992, Immunol. Rev. 130:151-188を参照されたい。)。 「二重特異的」又は「二機能性」抗体以外の抗体は、その結合部位の各々が同一であると理解される。抗体の過剰が、カウンター受容体に結合された受容体の量を、(インビトロ競合結合アッセイで測定された場合に)少なくとも約20%、40%、60%又は80%低下させ、より一般的には、約85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超低下させる場合に、抗体は、カウンター受容体への受容体の接着を実質的に阻害する。

【0078】

「単離された」抗体とは、その天然環境の成分から同定され、及び分離され、及び/又は回収されている抗体である。その天然環境の夾雑成分は、抗体に対する診断又は治療用途を妨害する物質であり、酵素、ホルモン及びその他のタンパク質又は非タンパク質性溶質が含まれ得る。好ましい実施形態において、抗体は、(1)Lowry法及びスピニングカップシークエネータの使用による末端又は内部アミン配列決定によって測定された場合に、抗体の重量を95%超まで、又は(2)クマシーブルー、若しくは好ましくは、銀染色を用いた、還元若しくは非還元条件下でのSDS-PAGEによる均一状態まで精製される。抗体の天然環境の少なくとも1つの成分が存在しないので、単離された抗体には、組換え細胞内のインシチュでの抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離された抗体は、少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0079】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分の配列が抗体間で大幅に異なり、並びに各特定の抗体の、その特定の抗原に対する結合及び特異性において使用されるという事実を表す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン全体に均一に分布しているわけではない。可変性は、何れも軽鎖及び重鎖可変ドメイン中に存在する相補性決定領域(CDR)又は超可変領域と呼ばれる3つのセグメント中に集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク(FR)と称される。原型の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、4つのFR領域(大部分はβシート立体構造を採り、3つのCDRによって接続されており、3つのCDRは、βシート構造を接続するループを形成し、幾つかの事例では、βシート構造の一部を形成する。)を含む。各鎖中のCDRは、FR領域によって、互いに近接した状態に保たれ、他の鎖由来のCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat et al. (1991)参照)。定常ドメインは、抗体を抗原に結合する上で直接に関与していないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与など、様々なエフェクター機能を示す。

【0080】

「Fv」は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最低の抗体断片である。二本鎖Fv種では、この領域は、緊密に非共有会合した1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv種では、1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインは、軽鎖及び重鎖が二本鎖Fv種の構造と同様の「二量体」構造に会合できるように、柔軟なペプチドリinkerによって共有結合され得る。各可変ドメインの3つのCDRが、VH-VL二量体の表面上の抗原結合部位を規定するために相互作用するのは、この立体配置中である。一括して、6つのCDRが抗体に対して抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、完全な結合部位より低い親和性であるが、抗原を認識及び結合する能力を有する。

【0081】

「超可変領域」という用語は、本明細書において使用される場合、抗原結合に必要とされる抗体のアミノ酸残基を表す。超可変領域は、一般に、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基24-34（L1）、50-62（L2）及び89-97（L3）並びに重鎖可変ドメイン中の31-55（H1）、50-65（H2）及び95-102（H3）；Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）及び/又は「超可変ループ」由来のアミノ酸残基（例えば、軽鎖可変ドメイン中の残基26-32（L1）、50-52（L2）及び91-96（L3）並びに重鎖可変ドメイン中の26-32（H1）、53-55（H2）及び96-101（H3）；Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）を含む。「フレームワーク領域」又は「FR」残基は、本明細書において定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

10

【0082】

本明細書において使用される場合、「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、特異的なリガンドと接触し、その特異性を決定する免疫学的受容体の一部を表す。免疫学的受容体のCDRは、受容体タンパク質の最も可変的な部分であり、受容体に多様性を付与し、受容体の可変ドメインの遠位末端に位置する6つのループ上に担持され、3つのループは、受容体の2つの可変ドメインの各々に由来する。

20

【0083】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」及び「ADCC」は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）が標的細胞上の結合された抗体を認識し、続いて、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞によって媒介される反応を表す。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現するのに対して、単球はFcγRI、FcγRII及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFc発現は、「Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)」の464ページの表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号又は第5,821,337号に記載されているものなどのインビトロADCCアッセイを行い得る。このようなアッセイに対する有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。これに代えて又はこれに加えて、目的の分子のADCC活性は、例えば、「Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1988)」に開示されているものなどの動物モデル中にて、インビボで評価し得る。

30

【0084】

「エピトープ」という用語には、免疫グロブリン及び/又はT細胞受容体に特異的な結合をすることができる、あらゆるポリペプチド決定基が含まれる。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特異的な三次元構造的特徴及び特異的な電荷特徴を有する。

40

【0085】

本明細書において、「因子」という用語は、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生物学的高分子又は生物物質から作製された抽出物を表記するために使用される。

【0086】

本明細書において使用される、「標識」又は「標識された」という用語は、例えば、放射性標識されたアミノ酸を取り込ませることによって、又は印を付けたアビジン（例えば、光学的方法又は比色分析法によって検出することができる、蛍光マーカー又は酵素活性を含有するストレプトアビジン）によって検出することができるビオチン部分をポリペプチドに付着させることによって、検出可能なマーカーを取り込むことを表す。ある状況に

50

において、前記標識又はマーカーは、治療用とすることもできる。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する様々な方法が本分野において公知であり、使用することができる。ポリペプチド用の標識の例には、以下の放射性同位体又は放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド、リン光体）、酵素的標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、及び二次レポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、発生し得る立体的障害を減らすために、標識には、様々な長さのスペーサーアームが付着される。

10

【0087】

本明細書において使用される「医薬因子又は医薬」という用語は、患者に適切に投与されたときに、所望の治療効果を誘導することができる化学的化合物又は組成物を表す。本明細書中の他の化学用語は、「McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))、参照により、本明細書に組み込まれる。」に例示されているように、本分野における慣用の用法に従って使用される。

【0088】

本明細書において、「抗悪性腫瘍薬」という用語は、ヒトの新生物、特に、癌腫、肉腫、リンパ腫又は白血病などの悪性（癌性）病変の発症又は進行を阻害するという機能的特性を有する因子を表すために使用される。転移の阻害は、しばしば、抗悪性腫瘍薬の特性である。

20

【0089】

本明細書において使用される「実質的に純粋な」とは、対象種が、存在する主要な種であることを意味し（すなわち、モルベースでは、対象種が、組成物中の他の何れの個々の種よりも豊富である。）、好ましくは、実質的に精製された画分は、対象種が存在する全ての高分子種の少なくとも約50%（モルベースで）を占める組成物である。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在する全ての高分子種の約80%超、より好ましくは、約85%超、90%超、95%超、96%超、97%超、98%超又は99%超を含む。最も好ましくは、対象種は、組成物が実質的に単一の高分子種からなる、実質的な均一状態（慣用的な検出法によって、英雑種が組成物中に検出できない。）に精製される。

30

【0090】

患者という用語には、ヒト及び動物対象が含まれる。

【0091】

治療における「哺乳動物」及び「動物」という用語は、ヒト、家畜及び農場動物、並びに動物園、スポーツ又はペット動物（イヌ、ウマ、ネコ、ウシなど）などの哺乳動物として分類される全ての動物を表す。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0092】

「疾病状態」という用語は、細胞若しくは身体機能、系または臓器の中断、停止又は異常が起こった細胞又は哺乳動物個体の生理的状态を表す。

40

【0093】

「治療する」又は「治療」という用語は、治療的処置及び予防的又は防止的措置の両方を表し、ここにおいて、目的は、癌の発達又は広がりなど、望ましくない生理的变化又は疾患を予防し、又は遅くする（弱める）ことである。本発明において、有益な又は所望の臨床的結果には、検出可能であると、又は検出不能であるとを問わない、症候の緩和、疾病の程度の減弱、疾病の安定化された（すなわち悪化しない）状態、疾病の進行の遅延又は減速、疾病状態の軽減又は緩和及び寛解（部分的又は完全であるかどうかを問わない。）が含まれるが、これらに限定されるものではない。「治療」は、治療を受けていない場

50

合に予測される生存に比べて、延長された生存も意味することが可能である。治療を必要とする者には、症状若しくは疾患を既に有する者及び症状若しくは疾患を有する傾向がある者又は症状若しくは疾患が予防されるべき者が含まれる。

【0094】

「疾患」とは、1つ又はそれ以上の治療が有益である何らかの症状である。これには、哺乳動物が問題の疾患に罹患し易い病理的症状を含む慢性及び急性の疾患又は疾病が含まれる。本明細書において治療されるべき疾患の非限定的な例には、良性及び悪性腫瘍、白血病及びリンパ系悪性腫瘍、特に、乳癌、直腸癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎臓癌、大腸癌、甲状腺癌、膵臓癌、前立腺癌又は膀胱癌が含まれる。本発明に従って治療されるべき好ましい疾患は、子宮頸癌及び頸部上皮内扁平上皮及び腺新生物、腎細胞癌(RCC)、食道腫瘍及び癌腫由来の細胞株などの悪性腫瘍である。

10

【0095】

「変異体EGFrポリペプチドに関連する疾病又は症状」には、以下のうちの1つ又はそれ以上、すなわち、変異体EGFrポリペプチドによって引き起こされる疾病又は症状、変異体EGFrポリペプチドが寄与する疾病又は症状、変異体EGFrポリペプチドを引き起こす疾病又は症状及び変異体EGFrポリペプチドの存在と関連する疾病又は症状が含まれる。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異体EGFrポリペプチドの不存在下で存在し得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異体EGFrポリペプチドの存在によって悪化され得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチドに関連する疾病又は症状は癌である。典型的な癌には、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、脳腫瘍、膀胱癌、頭部及び頸部癌、卵巣癌並びに前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0096】

「変異体PI3Kポリペプチドに関連する疾病又は症状」には、以下のうちの1つ又はそれ以上、すなわち、変異体PI3Kポリペプチドによって引き起こされる疾病又は症状、変異体PI3Kポリペプチドが寄与する疾病又は症状、変異体PI3Kポリペプチドを引き起こす疾病又は症状及び変異体PI3Kポリペプチドの存在と関連する疾病又は症状が含まれる。特定の実施形態において、変異体PI3Kポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異の不存在下で存在し得る。特定の実施形態において、変異体PI3Kポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異体PI3Kポリペプチドの存在によって悪化され得る。特定の実施形態において、変異体PI3Kポリペプチドに関連する疾病又は症状は癌である。典型的な癌には、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、脳腫瘍、膀胱癌、頭部及び頸部癌、卵巣癌並びに前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0097】

「変異体B-Rafポリペプチドに関連する疾病又は症状」には、以下のうちの1つ又はそれ以上、すなわち、変異体B-Rafポリペプチドによって引き起こされる疾病又は症状、変異体B-Rafポリペプチドが寄与する疾病又は症状、変異体B-Rafポリペプチドを引き起こす疾病又は症状及び変異体B-Rafポリペプチドの存在と関連する疾病又は症状が含まれる。特定の実施形態において、変異体B-Rafポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異の不存在下で存在し得る。特定の実施形態において、変異体B-Rafポリペプチドに関連する疾病又は症状は、変異体B-Rafポリペプチドの存在によって悪化され得る。特定の実施形態において、変異体B-Rafポリペプチドに関連する疾病又は症状は癌である。典型的な癌には、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、脳腫瘍、膀胱癌、頭部及び頸部癌、卵巣癌並びに前立腺癌が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0098】

「併用療法」において、患者は、化学療法剤又は抗悪性腫瘍剤及び/又は放射線療法と組み合わせて、標的抗原に対する特異的結合因子を用いて治療される。癌は、標準的な一次及び二次療法のために、変異体EGFrポリペプチドへの特異的結合因子の付加、変異

50

体 P I 3 K ポリペプチドへの特異的結合因子の付加及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドへの特異的結合因子の付加によるプロトコール下で治療される。プロトコールの設計は、腫瘍塊の減少によって評価される有効性及び標準的な化学療法の通常用量を減少させる能力に注目する。これらの投薬量の減少は、化学療法剤の用量関連毒性を減少させることによって、追加の治療及び / 又は延長された治療を可能とする。

【 0 0 9 9 】

「単独療法」は、化学療法又は抗悪性腫瘍剤を伴わずに、免疫療法を患者に施すことによる疾患の治療を表す。

【 0 1 0 0 】

(特定の実施形態)

ポリペプチド、断片及び融合タンパク質

特定の実施形態において、欠失バリエーションは完全長の変異体 E G F r ポリペプチドの断片である。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 E G F r ポリペプチドのエピトープに対応する。特定の実施形態において、このような断片は、(例えば、インビボプロテアーゼ活性によって)天然に存在する。特定の実施形態において、このような断片は化学的に合成される。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 E G F r 融合タンパク質を形成するために、ポリペプチドに連結され得る。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 5、6、8 又は 10 アミノ酸長である。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 14、少なくとも 20、少なくとも 50 又は少なくとも 70 アミノ酸長である。

10

20

【 0 1 0 1 】

特定の実施形態において、欠失バリエーションは、完全長の変異体 P I 3 K ポリペプチドの断片が提供される。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 P I 3 K ポリペプチドのエピトープに対応する。特定の実施形態において、このような断片は、(例えば、インビボプロテアーゼ活性によって)天然に存在する。特定の実施形態において、このような断片は化学的に合成される。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 P I 3 K 融合タンパク質を形成するために、ポリペプチドに連結され得る。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 5、6、8 又は 10 アミノ酸長である。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 14、少なくとも 20、少なくとも 50 又は少なくとも 70 アミノ酸長である。

30

【 0 1 0 2 】

特定の実施形態において、欠失バリエーションは、完全長の変異体 B - R a f ポリペプチドの断片が提供される。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 B - R a f ポリペプチドのエピトープに対応する。特定の実施形態において、このような断片は、(例えば、インビボプロテアーゼ活性によって)天然に存在する。特定の実施形態において、このような断片は化学的に合成される。特定の実施形態において、このような断片は、変異体 B - R a f 融合タンパク質を形成するために、ポリペプチドに連結され得る。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 5、6、8 又は 10 アミノ酸長である。特定の実施形態において、このような断片は、少なくとも 14、少なくとも 20、少なくとも 50 又は少なくとも 70 アミノ酸長である。

40

【 0 1 0 3 】

特定の実施形態において、変異体ポリペプチドは、少なくとも 1 つの非タンパク質に連結され得る。このような基には、N 結合型又は O 結合型炭水化物鎖、ポリエチレングリコール (P E G) などの水溶性ポリマー及びこれらの誘導体が含まれるが、これらに限定されない (例えば、米国特許第 4, 179, 337 号参照)。本用語の意味の範疇に属する他の化学的修飾には、エチレングリコール / プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール及び関連する分子が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 4 】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドは、分子内のランダムな位置に

50

において、又は分子内の所定の位置において修飾されることができ、1つ、2つ、3つ又はそれ以上の付着された化学的部分を含み得る。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドは、アミノ末端又はポリペプチド内の選択されたりジン若しくはアルギニン残基など、ポリペプチド中の所定の位置においても修飾され得る。他の化学的修飾には、変異体 E G F r ポリペプチドの検出及び単離を可能とするために、酵素標識、蛍光標識、同位体標識又はアフィニティー標識などの検出可能な標識が含まれるが、これらに限定されない。

【0105】

特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、分子内のランダムな位置において、又は分子内の所定の位置において修飾されることができ、1つ、2つ、3つ又はそれ以上の付着された化学的部分を含み得る。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、アミノ末端又はポリペプチド内の選択されたりジン若しくはアルギニン残基など、ポリペプチド中の所定の位置においても修飾され得る。他の化学的修飾には、変異体 P I 3 K ポリペプチドの検出及び単離を可能とするために、酵素標識、蛍光標識、同位体標識又はアフィニティー標識などの検出可能な標識が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0106】

特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、分子内のランダムな位置において、又は分子内の所定の位置において修飾されることができ、1つ、2つ、3つ又はそれ以上の付着された化学的部分を含み得る。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、アミノ末端又はポリペプチド内の選択されたりジン若しくはアルギニン残基など、ポリペプチド中の所定の位置においても修飾され得る。他の化学的修飾には、変異体 B - R a f ポリペプチドの検出及び単離を可能とするために、酵素標識、蛍光標識、同位体標識又はアフィニティー標識などの検出可能な標識が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0107】

特定の実施形態において、変異体 E G F r 融合タンパク質が提供される。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドは、ホモ二量体を形成するために相同なポリペプチドに融合することができ、又はヘテロ二量体を形成するために異種のポリペプチドに融合することができる。典型的な異種のポリペプチド及びペプチドには、融合タンパク質の検出及び/又は単離を可能とするためのエピトープ、膜貫通受容体タンパク質又はその一部(細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞内ドメインなど)、膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンド又はその一部;触媒的に活性である酵素又はその一部;オリゴマー化を促進するポリペプチド(ロイシンジッパードメインを含むが、これに限定されない。)、融合タンパク質の安定性を増加させるポリペプチド(免疫グロブリン定常領域を含むが、これに限定されない。)、並びに変異体 E G F r ポリペプチドと異なる治療的活性を有するポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチド又は変異体 E G F r 融合タンパク質は、N末端メチオニンへ連結することができ、これは、E . コリなどの原核細胞中での発現を可能とするために有用であり得る。

30

40

【0108】

特定の実施形態において、変異体 P I 3 K 融合タンパク質が提供される。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、ホモ二量体を形成するために相同なポリペプチドに融合することができ、又はヘテロ二量体を形成するために異種のポリペプチドに融合することができる。典型的な異種のポリペプチド及びペプチドには、融合タンパク質の検出及び/又は単離を可能とするためのエピトープ、膜貫通受容体タンパク質又はその一部(細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞内ドメインなど)、膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンド又はその一部;触媒的に活性である酵素又はその一部;オリゴマー化を促進するポリペプチド(ロイシンジッパードメインを含むが、これに限定されない。)、融合タンパク質の安定性を増加させるポリペプチド(免疫グロブリン定常領域を含

50

むが、これに限定されない。) 、並びに変異体 P I 3 K ポリペプチドと異なる治療的活性を有するポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチド又は変異体 P I 3 K 融合タンパク質は、N 末端メチオニンへ連結することができ、これは、E . コリなどの原核細胞中での発現を可能とするために有用であり得る。

【 0 1 0 9 】

特定の実施形態において、変異体 B - R a f 融合タンパク質が提供される。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、ホモ二量体を形成するために相同なポリペプチドに融合することができ、又はヘテロ二量体を形成するために異種のポリペプチドに融合することができる。典型的な異種のポリペプチド及びペプチドには、変異体 B - R a f 融合タンパク質の検出及び / 又は単離を可能とするためのエピトープ、膜貫通受容体タンパク質又はその一部 (細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン又は細胞内ドメインなど) 、膜貫通受容体タンパク質に結合するリガンド又はその一部 ; 触媒的に活性である酵素又はその一部 ; オリゴマー化を促進するポリペプチド (ロイシンジッパードメインを含むが、これに限定されない。) 、融合タンパク質の安定性を増加させるポリペプチド (免疫グロブリン定常領域を含むが、これに限定されない。) 、並びに変異体 B - R a f ポリペプチドと異なる治療的活性を有するポリペプチドが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチド又は変異体 B - R a f 融合タンパク質は、N 末端メチオニンへ連結することができ、これは、E . コリなどの原核細胞中での発現を可能とするために有用であり得る。

10

20

【 0 1 1 0 】

特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 E G F r ポリペプチドのアミノ末端に融合される。特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 E G F r ポリペプチドのカルボキシ末端に融合される。特定の実施形態において、1 つ又はそれ以上の異種又は相同ポリペプチド又はペプチドが、変異体 E G F r ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、変異体 E G F r ポリペプチドに直接融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、本分野において公知であるように、リンカー又はアダプター分子を介して、変異体 E G F r ポリペプチドに融合される。特定のこのような実施形態において、リンカー又はアダプター分子は、プロテアーゼが融合されるポリペプチドの分離を可能とするために、切断部位を含有するように設計される。

30

【 0 1 1 1 】

特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 P I 3 K ポリペプチドのアミノ末端に融合される。特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 P I 3 K ポリペプチドのカルボキシ末端に融合される。特定の実施形態において、1 つ又はそれ以上の異種又は相同ポリペプチド又はペプチドが、変異体 P I 3 K ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、変異体 P I 3 K ポリペプチドに直接融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、本分野において公知であるように、リンカー又はアダプター分子を介して、変異体 P I 3 K ポリペプチドに融合される。特定のこのような実施形態において、リンカー又はアダプター分子は、プロテアーゼが融合されるポリペプチドの分離を可能とするために、切断部位を含有するように設計される。

40

【 0 1 1 2 】

特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 B - R a f ポリペプチドのアミノ末端に融合される。特定の実施形態において、異種又は相同ポリペプチドは、変異体 B - R a f ポリペプチドのカルボキシ末端に融合される。特定の実施形態において、1 つ又はそれ以上の異種又は相同ポリペプチドが、変異体 B - R a f ポリペプチドのアミノ末端及びカルボキシ末端の両方に融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、変異体 B - R a f ポリペプチドに直接融合される。特定の実施形態において、ポリペプチドは、本分野において公知であるように、リンカー又はアダプター分子を介して、

50

変異体 B - R a f ポリペプチドに融合される。特定のこのような実施形態において、リンカー又はアダプター分子は、プロテアーゼが融合されるポリペプチドの分離を可能とするために、切断部位を含有するように設計される。

【 0 1 1 3 】

ベクター、宿主細胞、トランスジェニック動物並びにタンパク質産生及び精製

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 12 及び配列番号 13 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドは、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異を含む。特定の実施形態において、ベクターは発現ベクターである。

10

【 0 1 1 4 】

特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、配列番号 15、配列番号 16 及び配列番号 17 から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドは、E 5 4 2 K、E 5 4 5 A 及び H 1 0 4 7 L から選択される少なくとも 1 つの P I 3 K 変異を含む。特定の実施形態において、ベクターは発現ベクターである。

20

【 0 1 1 5 】

特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドをコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、配列番号 19 及び配列番号 20 から選択されるアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドは、V 6 0 0 E 及び K 6 0 1 E から選択される少なくとも 1 つの B - R a f 変異を含む。特定の実施形態において、ベクターは発現ベクターである。

【 0 1 1 6 】

特定の実施形態において、発現ベクターは、宿主生物によって認識され、及び変異体 E G F r をコードする核酸分子に作用可能に連結されたプロモーターを含有し得る。特定の実施形態において、発現のために使用される宿主細胞及び所望されるタンパク質の収率に応じて、原型のプロモーター又は異種のプロモーターを使用し得る。

30

【 0 1 1 7 】

原核細胞宿主とともに使用するための典型的なプロモーターには、β - ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン (t r p) プロモーター系並びに t a c プロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、他の公知の細菌プロモーターを使用し得る。公知の細菌プロモーターの配列は公表されており、これにより、当業者は、何れかの所望される制限部位を供給するために必要とされるリンカー又はアダプターを用いて、所望の核酸配列にそれらを連結することが可能となる。

40

【 0 1 1 8 】

酵母宿主とともに使用するための適切なプロモーターも、本分野において周知である。特定の実施形態において、酵母エンハンサーは、酵母プロモーターとともに有利に使用される。哺乳動物の宿主細胞とともに使用するための適切なプロモーターは、周知である。哺乳動物の宿主細胞とともに使用するための典型的なプロモーターには、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス (アデノウイルス 2 など)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルス、及び最も好ましくはサルウイルス 40 (S V 40) などのウイルスのゲノムから得られるものが含まれるが、これらに限定されない。典型的な哺乳動物プロモーターには、異種の哺乳動

50

物プロモーターが含まれるが、これに限定されない。典型的な異種の哺乳動物プロモーターには、熱ショックプロモーター及びアクチンプロモーターが含まれるが、これらに限定されない。

【0119】

変異体EGFrポリヌクレオチドを発現するために使用され得る典型的なプロモーターには、SV40早期プロモーター領域(Benoist and Chambon (1981), Nature, 290:304-310); CMVプロモーター; ラウス肉腫ウイルスの3'末端反復配列中に含有されるプロモーター(Yamamoto et al. (1980), Cell, 22:787-97); ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター(Wagner et al. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1444-5); メタロチオニン遺伝子の調節配列(Brinster et al. (1982), Nature, 296:39-42); β -ラクタマーゼプロモーターなどの原核発現ベクター(Villa-Kamaroff et al. (1978), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75:3727-31); 及びtacプロモーター(DeBoer, et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80:21-25)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

10

【0120】

特定の実施形態において、真核宿主細胞中での転写を増加させるために、ベクター中にエンハンサー配列を含め得る。哺乳動物遺伝子から得られる典型的なエンハンサー配列には、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェットタンパク質及びインシュリンが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ウイルスから得られるエンハンサーが使用される。真核生物プロモーターの活性化のための典型的なエンハンサー配列には、SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、エンハンサーは、ポリペプチドコード領域に対して5'及び3'の位置において、ベクター中にスプライスされ得る。特定の実施形態において、エンハンサーは、プロモーターから5'部位に位置する。特定の実施形態において、エンハンサーは、ポリペプチドコード領域の末端から3'部位に位置する。

20

【0121】

特定の実施形態において、ベクターは、細菌、昆虫及び哺乳動物の宿主細胞の少なくとも1つと適合性があるベクターである。典型的なベクターには、pCRII、pCR3及びpcDNA3.1(Invitrogen Company, San Diego, CA)、pBSII(Stratagene Company, La Jolla, CA)、pET15(Novagen, Madison, WI)、pGEX(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)、pEGFP-N2(Clontech, Palo Alto, CA)、pETL(BlueBacII; Invitrogen)、pDSR- α (PCT公開WO90/14363)並びにpFastBacDual(Gibco/BRL, Grand Island, NY)が含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【0122】

典型的なベクターには、選択された宿主細胞と適合性を有するコスミド、プラスミド及び修飾されたウイルスが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ベクターは、Bluescript^(R)プラスミド誘導体(高コピー数CoIEIベースのファジミド、Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla, CA)、Taq増幅されたPCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド(例えば、TOPOTMTA Cloning^(R) Kit、PCR2.1^(R)プラスミド誘導体、Invitrogen, Carlsbad, CA)及びバキュロウイルス発現系(pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech, Palo Alto, CA)などの哺乳動物、酵母又はウイルスベクターなどの

50

(これらに限定されない。) プラスミドを含み得る。特定の実施形態において、組換え分子は、形質転換、形質移入、注入、電気穿孔又はその他の公知の技術を介して、宿主細胞中に導入され得る。

【0123】

「形質移入」という用語は、何らかのコード配列が実際に発現されているか否かに関わらず、宿主細胞による発現ベクターの取り込みを表す。CaPO₄ 沈殿及び電気穿孔を含む(これらに限定されない。) 形質移入の多数の方法が当業者に公知である。特定の実施形態において、形質移入されたベクターの操作の何れかの指標が宿主細胞内に生じたときに、形質移入が成功したと認められる。

【0124】

特定の実施形態において、宿主細胞は、原核生物宿主細胞(E. コリなど)又は真核生物宿主細胞(酵母細胞、昆虫細胞又は脊椎動物細胞など)であり得る。特定の実施形態において、E. コリなどの原核生物宿主細胞は、グリコシル化されていないタンパク質、例えば、グリコシル化された真核生物分子に比べて利点を有し得るグリコシル化されていないshBCMA及びグリコシル化されていないshTACIを産生する。特定の実施形態において、宿主細胞は、適切な条件下で培養された場合に、その後培地から収集することが可能であるか(宿主細胞が媒地中に本発明のポリペプチドを分泌する場合)、又は本発明のポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集することが可能な(分泌されない場合)本発明のポリペプチドを発現する。特定の実施形態において、適切な宿主細胞の選択は、所望される発現レベル、活性に対して所望されるか又は必要とされるポリペプチド修飾(グリコシル化又はリン酸化など)及び/又は生物学的に活性な分子への折り畳みの容易さなどの様々な要素を考慮に入れる。

【0125】

多数の適切な宿主細胞が本分野において公知であり、多くは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC)、Manassas、VAから入手可能である。典型的な宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)(ATCC番号CCL61)、CHODHFR⁻細胞(Ur laub et al. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 4216-20)、ヒト胎児由来腎臓(HEK)293又は293T細胞(ATCC番号CRL1573)及び3T3細胞(ATCC番号CCL92)などの哺乳動物細胞が含まれるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞の選択並びに形質転換、培養、増幅、スクリーニング及び産物の産生及び精製の方法は、本分野において公知である。典型的な宿主細胞には、サルCOS-1(ATCC番号CRL1650)及びCOS-7細胞株(ATCC番号CRL1651)及びCV-1細胞株(ATCC番号CCL70)が含まれるが、これらに限定されない。典型的な哺乳動物宿主細胞には、霊長類細胞株及びげっ歯類細胞株(形質転換された細胞株を含む。)が含まれるが、これらに限定されない。典型的な宿主細胞には、正常な二倍体細胞、一次組織のインビトロ培養から得られる細胞株、幹細胞株及び一次外植が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、候補細胞は、選択遺伝子が欠失した遺伝子型であり得、又は優性的に作用する選択遺伝子を含み得る。典型的な宿主細胞には、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、Manassas、VAから入手できる、マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa、マウスL-929細胞、Swiss、Balb-c又はNIHマウスから得られる3T3株、BHK又はHaKハムスター細胞が含まれるが、これらに限定されない。これらの細胞株の各々は、タンパク質発現の分野の当業者によって公知であり、入手可能である。

【0126】

特定の実施形態において、宿主細胞は細菌細胞であり得る。典型的な細菌宿主細胞には、E. コリの様々な株が含まれるが、これらに限定されない(例えば、HB101、(ATCC番号33694)DH5 α 、DH10及びMC1061(ATCC番号53338))。典型的な宿主細胞には、シュドモナス属種、B. ズブチリス、その他のバチルス属種及びストレプトミセス属種の様々な株も含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0127】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株は、ポリペプチドの発現用の宿主細胞として利用することもできる。特定のこのような実施形態は、製造業者の指示書に従って、市販の発現系、例えば、*Pichia Expression System* (*Invitrogen*, *San Diego*, *CA*) を使用する。特定の実施形態において、このような系は、分泌を誘導するためにプレプロα配列に依拠する。ある実施形態において、挿入断片の転写は、メタノールによる誘導時に、アルコールオキシダーゼ (AOX1) プロモーターによって駆動される。特定の実施形態において、宿主細胞はサッカロミセス・セレビシア (*Saccharomyces cerevisiae*) であり得る。

【0128】

特定の実施形態において、植物細胞系は宿主細胞として使用され得る。特定のこのような実施形態において、ウイルス発現ベクター (例えば、カリフラワーモザイクウイルス、*CaMV* 又はタバコモザイクウイルス) で形質移入された植物細胞系が使用される。

【0129】

特定の実施形態において、変異体 EGF α ポリペプチド、変異体 PI3K ポリペプチド及び/又は変異体 B-Raf ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、*pVL1393* (*PharMingen*, *San Diego*, *CA*) などのバキュロウイルス発現ベクター中にクローニングされる。特定の実施形態において、このようなベクターは、無 *SF9* タンパク質培地中でスポドプテラ・フルギベルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞を感染させるために、及び組換えポリペプチドを産生するために、製造業者の指示 (*PharMingen*) に従って使用することが可能である。特定の実施形態において、変異体 EGF α ポリペプチド、変異体 PI3K ポリペプチド及び/又は変異体 B-Raf ポリペプチドは、ヘパリン・セファロースカラム (*Pharmacia*) を用いて、このような培地から精製及び濃縮される。

【0130】

特定の実施形態において、昆虫細胞系は宿主細胞として使用され得る。特定のこのような系は、例えば、「*Kitts et al.* (1993), *Biotechniques*, 14: 810-7, *Lucklow* (1993)」、「*Curr. Opin. Biotechnol.*, 4: 564-72」及び「*Lucklow et al.* (1993), *J. Virol.*, 67: 4566-79」に記載されている。典型的な昆虫細胞には、*Sf-9* 及び *Hi5* (*Invitrogen*, *Carlsbad*, *CA*) が含まれるが、これに限定されない。

【0131】

特定の実施形態において、選択された宿主細胞中への、変異体 EGF α ポリペプチド、変異体 PI3K ポリペプチド及び/又は変異体 B-Raf ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの形質転換又は形質移入は、塩化カルシウム、電気穿孔、微小注入、リポフェクション又は DEAE-デキストラン法などの方法を含む周知の方法によって達成され得る。特定の実施形態において、選択された方法は、部分的に、使用されるべき宿主細胞の種類に依る。これらの方法及びその他の適切な方法は当業者に周知であり、例えば、「*Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, *Cold Spring Harbor*, *N.Y.* (1989))」に記載されている。

【0132】

変異体 EGF α ポリペプチド、変異体 PI3K ポリペプチド及び/又は変異体 B-Raf ポリペプチドをコードする発現ベクターを (形質転換又は形質移入によって) 含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を用いて培養され得る。特定の実施形態において、培地は、細胞の増殖及び生存に必要な全ての栄養素を含有し得る。特定の実施形態において、E. コリ細胞は、*Luria Broth* (LB) 及び/又は *Terrific Broth* (TB) 中で培養され得る。真核細胞を培養するための典型的な培地には、RP

10

20

30

40

50

MI1640、MEM、DMEMが含まれるが、これらに限定されるものではなく、これらの全てには、培養されている具体的な細胞株に応じて、血清及び／又は成長因子を補充し得る。特定の実施形態において、昆虫細胞は、酵母抽出粉末(yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解物及び／又はウシ胎児血清が補充されたGraceの媒地中で培養され得る。

【0133】

特定の実施形態において、形質移入された細胞又は形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質又はその他の化合物が、培地への補充物として添加される。特定の実施形態において、使用されるべき化合物は、宿主細胞を形質転換するプラスミド上に存在する選択可能なマーカー要素の見地から選択される。選択可能なマーカー要素がカナマイシン耐性である、特定の実施形態において、培地に添加される化合物はカナマイシンである。選択的な増殖のための典型的な化合物には、アンピシリン、テトラサイクリン及びネオマイシンが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0134】

特定の実施形態において、宿主細胞によって産生される、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドの量は、本分野で公知の標準的な方法を用いて評価することが可能である。典型的な方法には、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、HPLC分離、免疫沈降及び活性アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0135】

特定の実施形態において、原核宿主細胞中で発現される変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドは、細胞質周辺腔若しくは細胞質中の可溶性形態で、又は細胞内封入体の一部として、不溶性形態で存在し得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドは、当業者に公知の何れかの標準的な技術を用いて、宿主細胞から抽出することが可能である。特定の実施形態において、その後遠心が行われる、フレンチプレス、ホモゲナイズ及び／又は音波処理によって周辺質／細胞質の内容物を放出させるために、宿主細胞を溶解することが可能である。

【0136】

特定の実施形態において、細胞質中に存在するか、又は細胞質周辺腔から放出される、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドの可溶性形態は、本分野で公知の方法を用いて、さらに精製され得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドは、浸透圧ショック技術によって、細菌の細胞質周辺腔から放出される。

30

【0137】

変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドが形成された封入体を有する場合、これらは、しばしば、細胞内膜及び／又は細胞外膜に結合し得るので、遠心後、主に、ペレット材料中に見出される。特定の実施形態において、ペレット材料は、次いで、封入体を放出し、分解し、及び可溶化するために、極端なpHで処理され、又はアルカリpHのジチオスレイトール若しくは酸性pHのトリスカルボキシエチルホスフィン、などの還元剤の存在下で、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素又は尿素誘導体などのカオトロピック剤で処理され得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドは、次いで、ゲル電気泳動、免疫沈降などを用いて分析し得る。特定の実施形態において、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び／又は変異体B-Rafポリペプチドは、以下に記載されている、及び「Marston et al. (1990), Meth. Enz., 182: 264-75」に記載されているものなどの標準的な方法を用いて単離され得る。

40

【0138】

50

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドは、単離時に、生物学的に活性でない場合があり得る。特定の実施形態において、生物活性を回復するために、ポリペプチドを「再折り畳み」する、すなわちポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド結合を生成する方法を使用し得る。特定の実施形態において、生物活性は、カオトロープの特定の濃度の存在下で、通常は 7 を上回る pH に、可溶化されたポリペプチドを曝露することによって回復され得る。カオトロープの選択は、封入体可溶化のために使用される選択と極めて類似しているが、特定の実施形態において、カオトロープは、より低い濃度で使用され、可溶化のために使用されるカオトロープと必ずしも同一でない。特定の実施形態において、再折り畳み / 酸化溶液は、タンパク質のシステイン架橋の形成時にジスルフィドシャッフルリングが起こるようにする特定の酸化還元電位を生成するために、還元対又は特定の比率でその酸化形態を加えた還元対も含有する。適切な酸化還元対には、システイン / シスタミン、グルタチオン (G S H) / ジチオビス G S H、塩化第二銅、ジチオスレートール (D T T) / ジチアン D T T 及び 2 - メルカプトエタノール (b M E) / ジチオ - b (M E) が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、再折り畳みの効率を増加させるために、共溶媒を使用し得るか、又は必要とし得、この目的のために使用される典型的なリパートナー (r e p a r t n e r) には、グリセロール、様々な分子量のポリエチレングリコール、アルギニン及び関連分子が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

【 0 1 3 9 】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドは、化学合成法によって調製され得る。特定の実施形態において、化学的合成法は、固相ペプチド合成を取り込み得る。特定の実施形態において、化学的合成法は、「Merrifield et al. (1963), J. Am. Chem. Soc., 85 : 2149」; 「Houghten et al. (1985), Proc Natl Acad. Sci. USA, 82 : 5132」; 及び「Stewart and Young (1984), Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL」に記載されているものなど、本分野において公知の技術を使用し得る。特定の実施形態において、ポリペプチドは、アミノ末端上のメチオニンあり又はなしに合成され得る。特定の実施形態において、化学的に合成された、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドは、ジスルフィド架橋を形成するために、これらの参考文献中に記載されている方法を用いて酸化され得る。特定の実施形態において、このようにして調製された変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドは、原型の又は組換え的に産生された、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドに付随する少なくとも 1 つの生物活性を保持する。

30

【 0 1 4 0 】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は変異体 B - R a f ポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物を使用し得る。特定の実施形態において、トランスジェニックミルク産生動物 (例えば、ウシ又はヤギ) を使用し、動物のミルク中に、グリコシル化された変異体 E G F r ポリペプチド、グリコシル化された変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又はグリコシル化された変異体 B - R a f ポリペプチドを取得し得る。特定の実施形態において、本分野において公知であるように、グリコシル化された変異体 E G F r ポリペプチド、グリコシル化された変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又はグリコシル化された変異体 B - R a f ポリペプチドを産生するために、植物が使用される。

40

【 0 1 4 1 】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドを実質的に精製する。特定の実

50

施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドを実質的に精製する。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドを実質的に精製する。特定のタンパク質精製技術は、当業者に公知である。特定の実施形態において、タンパク質精製は、非ポリペプチド画分からのポリペプチド画分の粗分画を含む。特定の実施形態において、ポリペプチドは、クロマトグラフィー及び/又は電気泳動技術を用いて精製される。典型的な精製法には、硫酸アンモニウムを用いた沈殿、P E Gを用いた沈殿、免疫沈降、熱変性後の遠心、アフィニティークロマトグラフィー（例えば、P r o t e i n - A - S e p h a r o s e ）、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー、ゲルろ過、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーを含む（これらに限定されない。）クロマトグラフィー、等電点電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動並びにこのような技術及びその他の技術の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ポリペプチドは、高速タンパク質液体クロマトグラフィー又は高圧液体クロマトグラフィー（H P L C ）によって精製される。特定の実施形態において、精製工程は変化され得、又は特定の工程は省略され得、実質的に精製されたポリペプチドの調製のための適切な方法をなおもたらす。

10

【 0 1 4 2 】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチド、変異体 P I 3 K ポリペプチド及び/又は B - R a f ポリペプチドは、カルボキシ末端又はアミノ末端の何れかに位置する、ヘキサヒスチジンなどの1つ若しくはそれ以上のアフィニータグ又は F L A G (E a s t m a n K o d a k C o . , N e w H a v e n , C T) 若しくは m y c (I n v i t r o g e n) などの他の小ペプチドとともに調製され得、及び一工程アフィニティークラムによって精製され得る。特定の実施形態において、ポリヒスチジンは、ニッケルに、大きな親和性と特異性で結合するので、ニッケルのアフィニティークラム（Q i a g e n (R) ニッケルカラムなど）は、ポリヒスチジントグ化特異的結合対の精製のために使用することが可能である。例えば、「A u s u b e l e t a l . , e d s (1 9 9 3) , C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , S e c t i o n 1 0 . 1 1 . 8 , J o h n W i l e y & S o n s , N e w Y o r k 」を参照。特定の実施形態において、2以上の精製工程を使用し得る。

20

【 0 1 4 3 】

特定の実施形態において、ポリペプチド調製の精製の程度を定量化する。精製の程度を定量化するための特定の方法及び、当業者に公知である。特定の典型的な方法には、調製物の特異的結合活性を測定すること及び S D S / P A G E 分析によって調製物内のポリペプチドの量を評価することが含まれるが、これらに限定されない。ポリペプチド調製物の精製の量を評価するための特定の典型的な方法は、調製物の結合活性を計算すること、及びこれを初期抽出物の結合活性と比較することを含む。ある実施形態において、このような計算の結果は、「精製倍数」として表される。結合活性の量を表すために使用される単位は、実施されているアッセイに依存する。

30

【 0 1 4 4 】

特定の実施形態において、ポリペプチドは部分的に精製される。特定の実施形態において、部分精製は、より少ない精製工程を使用することによって、又は同じ一般的な精製スキームの異なる形態を用いることによって達成し得る。例えば、ある実施形態において、H P L C 装置を用いて行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般的には、低圧クロマトグラフィーシステムを用いた同じ技術より大きな「精製倍数」をもたらす。特定の実施形態において、より低い精製度をもたらす方法は、ポリペプチドの総回収率の上で、又はポリペプチドの結合活性を維持する上で利点を有し得る。

40

【 0 1 4 5 】

ある例において、ポリペプチドの電気泳動的遊走は、S D S / P A G E の異なる条件によって、時折著しく変動し得る。例えば、「C a p a l d i e t a l . , B i o c h e m B i o p h y s / R e s C o m m , 7 6 : 4 2 5 (1 9 7 7) 」を参照されたい。当然のことながら、異なる電気泳動条件下では、精製又は部分精製されたポリペプチド

50

の見かけの分子量は異なり得る。

【0146】

トランスジェニック動物

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチド、1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチド及び / 又は1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むヒト以外のトランスジェニック動物が提供される。特定の実施形態において、ヒト以外のトランスジェニック動物には、マウス又はラットなどのげっ歯類、ウサギ、ヤギ、ヒツジ及びその他の農場動物が含まれるが、これらに限定されない。特定のトランスジェニック動物は、米国特許第5,489,743号及びWO94/28122号に記載されているものなどの(これらに限定されない。)周知の方法を用いて調製され得る。

10

【0147】

特定の実施形態において、トランスジェニック動物を構築するために、組織特異性を示す動物転写調節領域を使用し得る。トランスジェニック動物中での組織特異的発現とともに使用するための典型的な転写調節領域には、膵臓腺房細胞中で活性であるエラスターゼ I 遺伝子調節領域 (Swift et al. (1984), Cell, 38:639-46; Ornitz et al. (1986), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald (1987), Hepatology, 7:425-515); 膵臓β細胞中で活性であるインシュリン遺伝子調節領域 (Hanahan (1985), Nature, 315:115-122); リンパ系細胞中で活性である免疫グロブリン遺伝子調節領域 (Grosschedl et al. (1984), Cell, 38:647-58; Adames et al. (1985), Nature, 318:533-8; Alexander et al. (1987), Mol. Cell. Biol., 7:1436-44); 精巣、乳房、リンパ系及び肥満細胞中で活性であるマウス乳癌ウイルス調節領域 (Leder et al. (1986), Cell, 45:485-95); 肝臓中で活性であるアルブミン遺伝子調節領域 (Pinkert et al. (1987), Genes and Devel., 1:268-76); 肝臓中で活性であるαフェトプロテイン遺伝子調節領域 (Krumlauf et al. (1987), Mol. Cell. Biol., 5:1639-48; Hammer et al. (1987), Science, 235:53-58); 肝臓中で活性であるα1-アンチトリプシン遺伝子調節領域 (Kelsey et al. (1987), Genes and Devel., 1:161-171); 骨髄系細胞中で活性であるβグロビン遺伝子調節領域 (Mogram et al. (1985), Nature, 315:338-340; Kollias et al. (1986), Cell, 46:89-94); 脳の乏突起膠細胞中で活性であるミエリン塩基性タンパク質遺伝子調節領域 (Readhead et al. (1987), Cell, 48:703-712); 骨格筋中で活性であるミオシン軽鎖-2遺伝子調節領域 (Sani (1985), Nature, 314:283-286); 及び視床下部中で活性である性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子調節領域 (Mason et al. (1986), Science, 234:1372-8) が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0148】

特定の実施形態において、野生型 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが中断されており(すなわち、「ノックアウトされた」)、並びに野生型 E G F r ポリペプチドの発現のレベルが、動物中で有意に減少し、又は完全に喪失し、及び変異体 E G F r ポリペプチドが動物中で発現されるように、変異体 E G F r ポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドで置換されているヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、米国特許第5,557,032号に記載されている技術及び方法又は本分野において周知の他の技術などの技術及び方法を用いて、動物が調製され得る。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの

50

発現のレベルを変化させるために、（例えば、本分野で公知の相同的組み換え法を用いることによって）１つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドに対するプロモーターの活性が調節されたヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドの発現のレベルは増加される。特定のこのような実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドの発現のレベルは減少される。

【 0 1 4 9 】

特定の実施形態において、野生型 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが中断されており（すなわち、「ノックアウトされた」）、並びに野生型 P I 3 K ポリペプチドの発現のレベルが、動物中で有意に減少し、又は完全に喪失し、及び変異体 P I 3 K ポリペプチドが動物中で発現されるように、変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードする 1 つ又はそれ以上のポリヌクレオチドで置換されているヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、米国特許第 5 , 5 5 7 , 0 3 2 号に記載されている技術及び方法又は本分野において周知の他の技術などの技術及び方法を用いて、動物が調製され得る。特定の実施形態において、１つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現のレベルを変化させるために、（例えば、本分野で公知の相同的組み換え法を用いることによって）１つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドに対するプロモーターの活性が調節されたヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現のレベルは増加される。特定のこのような実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現のレベルは減少される。

10

20

【 0 1 5 0 】

特定の実施形態において、野生型 B - R a f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが中断されており（すなわち、「ノックアウトされた」）、並びに野生型 B - R a f ポリペプチドの発現のレベルが、動物中で有意に減少し、又は完全に喪失し、及び変異体 B - R a f ポリペプチドが動物中で発現されるように、変異体 B - R a f ポリペプチドをコードする 1 つ又はそれ以上のポリヌクレオチドで置換されているヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、米国特許第 5 , 5 5 7 , 0 3 2 号に記載されている技術及び方法又は本分野において周知の他の技術などの技術及び方法を用いて、動物が調製され得る。特定の実施形態において、１つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの発現のレベルを変化させるために、（例えば、本分野で公知の相同的組み換え法を用いることによって）１つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドに対するプロモーターの活性が調節されたヒト以外の動物が提供される。特定のこのような実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドの発現のレベルは増加される。特定のこのような実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドの発現のレベルは減少される。

30

40

【 0 1 5 1 】

特定の実施形態において、薬物候補のスクリーニングのために、ヒト以外のトランスジェニック動物を使用することが可能である。特定の実施形態において、ヒト以外のトランスジェニック動物に対する薬物候補の影響が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの発現を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの発現を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの活性を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの活性を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの活性化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの活性化を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化を増加させる能力が測定される。

【 0 1 5 2 】

特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 E G F r ポリペプチドへの、１つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態に

50

において、薬物候補が、変異体 E G F r ポリペプチドへの、1つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 E G F r ポリペプチドに関連する疾病又は症状を軽減する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 E G F r ポリペプチド関連癌を軽減させる能力が測定される。

【0153】

特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性化を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 P I 3 K ポリペプチドの自己リン酸化を増加させる能力が測定される。

10

【0154】

特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 P I 3 K ポリペプチドへの、1つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 P I 3 K ポリペプチドへの、1つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 P I 3 K ポリペプチドに関連する疾病又は症状を軽減する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 P I 3 K ポリペプチド関連癌を軽減させる能力が測定される。

20

【0155】

特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの発現を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの発現を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの活性を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの活性を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの活性化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの活性化を増加させる能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が変異体 B - R a f ポリペプチドの自己リン酸化を増加させる能力が測定される。

30

【0156】

特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 B - R a f ポリペプチドへの、1つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を減少又は抑制する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 B - R a f ポリペプチドへの、1つ又はそれ以上の特異的結合因子の結合を増加させる能力が測定される。特定のこのような実施形態において、薬物候補が、変異体 B - R a f ポリペプチドに関連する疾病又は症状を軽減する能力が測定される。特定の実施形態において、薬物候補が、変異体 B - R a f ポリペプチド関連癌を軽減させる能力が測定される。

40

【0157】

特異的結合因子及び抗体

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドに対する特異的結合因子が提供される。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する特異的結合因子が提供される。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドに対する特異的

50

結合因子が提供される。特定のこのような実施形態において、特異的結合因子は抗体又はその抗原結合断片である。

【0158】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、「Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)」によって初めて記載されたハイブリドーマ法を用いて作製し得る。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は、組換えDNA法によって作製し得る（米国特許第4,816,567号）。

【0159】

ハイブリドーマ法の特定の実施形態において、マウス又は他の適切な宿主動物（ハムスター又はマカクザルを含むが、これらに限定されない。）は、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生し、又は産生することができるリンパ球を惹起するために免疫される。特定の実施形態において、リンパ球はインビトロで免疫され得る。特定の実施形態において、リンパ球又はB細胞が濃縮されたリンパ球は、電気細胞融合法によって、又はポリエチレングリコールなどの適切な融合剤を用いることによって骨髄腫細胞と融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, [Academic Press, 1996]）。

【0160】

特定の実施形態において、非融合親骨髄腫細胞の増殖又は生存を阻害する1つ又はそれ以上の物質を好ましくは含有する適切な媒地中に、ハイブリドーマ細胞が播種され、増殖される。特定の実施形態において、親骨髄腫細胞が、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPR T）を欠如している場合には、ハイブリドーマ用培地は、典型的には、HGPRT欠損細胞の増殖を抑制する物質である、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン（HAT培地）を含む。

【0161】

特定の実施形態において、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、及びHAT培地などの培地に対して感受性である骨髄腫細胞が選択される。典型的な骨髄腫細胞株には、「Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA」から入手可能なMOP-21及びMC-11マウス腫瘍並びに「American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA」から入手可能なSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されるものなどのマウス骨髄腫株が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ヒト骨髄腫及び/又はマウス-ヒトヘロ骨髄腫細胞株が、ヒトモノクローナル抗体の産生のために使用される（Kozbor, J. Immunol. 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, [1987]）。

【0162】

特定の実施形態において、ハイブリドーマ細胞がその中で増殖している培地は、抗原に対して誘導されたモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。特定の実施形態において、ハイブリドーマ細胞によって産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、又はインビトロでの結合アッセイによって測定される。典型的な結合アッセイには、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）及び「Munson et al., Anal. Biochem. 107: 220 (1980)」のスクヤッチャード分析が含まれるが、これらに限定されない。

【0163】

特定の実施形態において、所望される特異性、親和性及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、細胞は、限界希釈操作によってサブクローニングし

10

20

30

40

50

、及び標準的な方法によって増殖し得る (Goding , Monoclonal Antibodies : Principles and Practice , pp . 59 - 103 , Academic Press , 1996) 。この目的のための典型的な培地には、DMEM及びRPMI - 1640培地が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ハイブリドーマ細胞は、動物中の腹水腫瘍としてインビボで増殖され得る。

【 0 1 6 4 】

特定の実施形態において、サブクローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの慣用の免疫グロブリン精製操作によって、培地、腹水液又は血清から適切に分離される。

10

【 0 1 6 5 】

特定の実施形態において、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、慣用の手順を用いて (例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって) 容易に単離及び配列決定される。特定のこのような実施形態において、ハイブリドーマ細胞は、このようなポリヌクレオチドの好ましい採取源としての役割を果たす。特定の実施形態において、単離されたポリヌクレオチドは発現ベクター中に配置され得る。特定のこのような実施形態において、発現ベクターは、組換え宿主細胞中でのモノクローナル抗体の合成を取得するために宿主細胞中に形質移入される。典型的な宿主細胞には、本来免疫グロブリンタンパク質を産生しない、E . コリ細胞、サル C O S 細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞又は骨髓腫細胞が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、ポリヌクレオチドは、例えば、非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全部又は一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合させることにより、修飾することができ、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体を作製する。

20

【 0 1 6 6 】

特定の実施形態において、非免疫グロブリンポリペプチドが、抗体の定常ドメインを置換する。特定の実施形態において、標的抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位と異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位とを含むキメラ二価抗体を作製するために、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインを非免疫グロブリンポリペプチドと置換する。

30

【 0 1 6 7 】

特定の実施形態において、キメラ又はハイブリッド抗体は、架橋剤を含むものなど (これに限定されない。) の合成タンパク質化学中の公知の方法を用いてインビトロで調製することが可能である。特定のこのような実施形態において、イムノトキシンは、ジスルフィド交換反応を用いて、又はチオエーテル結合を形成することによって構築することが可能である。この目的のための典型的な試薬には、イミノチオラート及びメチル - 4 - メルカプトブチルイミダートが含まれるが、これらに限定されない。

【 0 1 6 8 】

特定の実施形態において、標的抗原に対するヒト抗体が提供される。特定の実施形態において、融合対としてヘテロ骨髓腫 (マウス×ヒトハイブリッド骨髓腫) を用いてヒト抗体を作製するために、ハイブリドーマ技術が拡張される (例えば、Kozbor , J . Immunol . 133 : 3001 (1984) ; Brodeur et al . , Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications , pp . 51 - 63 , Marcel Dekker , Inc . , New York , 1987 を参照。) 。特定の実施形態において、ヒト抗体分泌細胞は、エプスタイン・バーウイルス (E B V) での感染によって不死化することが可能である (James and Bell , J . Immunol . Methods 100 : 5 - 40 [1987]) 。特定の実施形態において、ヒトB細胞の不死化は、形質転換遺伝子の所定の組み合わせを導入することによって達成することが可能である

40

50

(Hahn et al., Nature 400:464-468 [1999])。
【0169】

特定の実施形態において、免疫化すると、内在性免疫グロブリン産生の不存在下でヒト抗体のレパートリーを作製することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）が、ヒト抗体を作製するために使用される（例えば、Jakobovits et al., Nature 362:255-258 [1993]; Lonberg and Hulszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 [1995]; Fishwild et al., Nat. Biotechnol. 14:845-851 [1996]; Mendez et al., Nat. Genet. 15:146-156 [1997]; Green, J. Immunol. Methods 231:11-23 [1999]; Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727 [2000]; reviewed in Little et al., Immunol. Today 21:364-370 [2000] 参照）。キメラ及び生殖系列変異体マウス中の抗体重鎖連結領域（ J_H ）遺伝子のホモ接合欠失は、内在性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている（Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555 [1993]）。このような生殖系列変異体マウス中にヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイを導入することにより、抗原誘発時にヒト抗体の産生をもたらす（Jakobovits et al., Nature 362:255-258 [1993]）。

10

20

【0170】

Mendezら（Nature Genetics 15:146-156 [1997]）は、抗原で誘発されたときに、高親和性の完全なヒト抗体を生成する、「Xenomouse^(R) II」と称されるトランスジェニックマウスの系列を作製した。これは、内在性 J_H セグメント中に欠失を有するマウス中への、メガベースヒト重鎖及び軽鎖座位の生殖系列組み込みによって達成された。Xenomouse^(R) IIは、約66の V_H 遺伝子、完全な D_H 及び J_H 領域及び3つの異なる定常領域（ μ 、 δ 及び λ ）を含有するヒト重鎖座位の1,020 kbを保有し、32 V_K 遺伝子遺伝子、 J_K セグメント及び C_K 遺伝子を含有するヒト K 座位の800 kbも保有する。特定の実施形態において、これらのマウス中で産生される抗体は、遺伝子再編成、集合及びレパートリーを含む全ての点でヒトに見られる抗体と酷似する。特定の実施形態において、ヒト抗体は、マウス座位中の遺伝子再編成を抑制する内在性 J_H セグメント中の欠失のために、内在性抗体に比べて優先的に発現される。

30

【0171】

特定の実施形態において、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニック動物（例えば、Xenomouse^(R) II (Abgenix, Inc.))は、変異体EGFrポリペプチド、変異体PI3Kポリペプチド及び/又は変異体B-Rafポリペプチドなど、特に興味のある抗原で免疫化され得る。特定の実施形態において、これらの免疫化された動物から得られる血清は、初期抗原に対する抗体反応性についてスクリーニングされる。特定の実施形態において、リンパ球はリンパ節又は脾細胞から単離され、CD138陰性及びCD19⁺細胞について選択することにより、B細胞に関してさらに濃縮され得る。特定の実施形態において、これらのB細胞培養（BCC）は、上に詳述されているようにハイブリドーマを作製するために、骨髓腫細胞に融合される。特定の実施形態において、これらのB細胞培養物は、初期抗原に対する反応性についてさらにスクリーニングされる。このようなスクリーニングには、ELISA、目的の抗原を結合する公知の抗体を用いた競合アッセイ及び抗原を発現する一過性に形質移入されたCHO細胞へのインピット結合が含まれるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、目的の抗体を分泌する単一のB細胞が、特異的な溶血斑アッセイによって同定される。特定のこのような実施形態において、溶解の標的とされる細胞は、前記抗原で被覆されたヒツジ赤血球（SRBC）である。特定のこのような実施形態において、斑の形成は、標的細胞の特異

40

50

的抗原媒介性溶解を示し、従って、目的の免疫グロブリン及び補体を分泌するB細胞培養の存在を示す。特定のこのような実施形態において、斑の中心にある単一の抗原特異的形質細胞を単離し、mRNAの単離のために使用することが可能である。

【0172】

特定の実施形態において、分泌された抗体の可変領域をコードするポリヌクレオチドは、逆転写酵素PCRを用いてクローニングすることが可能である。特定の実施形態において、クローニングされたポリヌクレオチドは、pcDNA、又は免疫グロブリン重鎖及び軽鎖の定常ドメインを含有するpcDNAベクターなどのベクターカセットなどの適切な発現ベクター中にさらに挿入される。特定の実施形態において、作製されるベクターは宿主細胞（すなわち、CHO細胞）中に形質移入され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された慣用の栄養素培地中で培養される。

【0173】

特定の実施形態において、ファージディスプレイ技術は、免疫化されていないドナーから得られる免疫グロブリン可変（V）ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体及び抗体断片をインビトロで作製するために使用される（例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]; reviewed in Kipriyanov and Little, Mol. Biotechnol. 12:173-201 [1999]; Hoogenboom and Chames, Immunol. Today 21:371-378 [2000] 参照）。特定のこのような実施形態において、抗体Vドメイン遺伝子は、M13又はfdなどの糸状バクテリオファージのメジャー又はマイナーコートタンパク質遺伝子の何れか中に、インフレームにクローニングされ、ファージ粒子の表面上に、機能的な抗体断片として提示される。特定の実施形態において、糸状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有し、抗体の機能的特性に基づく選択も、これらの特性を示す抗体をコードする遺伝子の選択をもたらす。ファージディスプレイは、以下の文書：Johnson and Chiswell, Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 [1993]; Winter et al., Annu. Rev. Immunol. 12:433-455 [1994]; Dall'Acqua and Carter, Curr. Opin. Struct. Biol. 8:443-450 [1998]; and Hoogenboom and Chames, Immunol. Today 21:371-378 [2000] 中に特定されているものを含む（但し、これらに限定されない。）様々な形式で実施することが可能である。ファージディスプレイ用のV遺伝子セグメントの源には、免疫化されたマウスの脾臓から誘導されたV遺伝子の小ランダムコンビナトリアルライブラリー（Clackson et al., Nature 352:624-628 [1991]）及び免疫されていないヒトドナー由来のV遺伝子のレパートリー（Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)、又はGriffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)）が含まれるが、これに限定されるものではない。

【0174】

特定の実施形態において、天然免疫反応において、抗体遺伝子は高い速度で変異を蓄積する（体細胞超変異）。特定の実施形態において、導入された変化の幾つかは、より高い親和性を付与する。特定の実施形態において、高親和性表面免疫グロブリンを提示するB細胞は、その後の抗原誘発の間に、優先的に複製及び分化される。特定の実施形態において、この天然の過程は、「チェーンシャフリング」として知られる技術（Marks et al., Bio/Technol. 10:779-783 [1992]）を用いることによって模倣することが可能である。特定のこのような実施形態において、ファージディスプレイによって得られた「一次」ヒト抗体の親和性は、重鎖及び軽鎖V領域遺伝子を、免疫化されていないドナーから得られたVドメイン遺伝子の天然に存在するバリエーション

のレパートリー（レパートリー）と順次置換することによって改善することが可能であり、 nM 域の親和性を有する抗体及び抗体断片の産生を可能とする。特定の実施形態において、「Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21 : 2265 - 2266 (1993)」によって記載されているように、極めて巨大なファージ抗体レパートリーが構築される（「マザー・オブ・オール・ライブラリー」としても知られる。）。特定の実施形態において、高親和性ヒト抗体は、巨大なファージライブラリーから直接単離される（例えば、Griffiths et al., EMBO J. 13 : 3245 - 3260 (1994) 参照）。特定の実施形態において、げっ歯類抗体からヒト抗体を誘導するために遺伝子シャッフリングを使用することが可能であり、ヒト抗体は、出発するげっ歯類抗体と類似の親和性及び特異性を有する。特定のこのような実施形態において、ファージディスプレイ技術によって得られたげっ歯類抗体の重鎖又は軽鎖Vドメイン遺伝子は、ヒトVドメイン遺伝子のレパートリーと置換され、げっ歯類・ヒトキメラ（「エピトープインプリンティング」とも称される。）を作出する。特定の実施形態において、抗原による可変領域の選択は、機能的な抗原結合部位を回復することが可能なヒト可変領域の単離をもたらす。すなわち、エピトープがパートナーの選択を支配（インプリント）する。特定の実施形態において、残存するげっ歯類Vドメインを置換するために本過程が反復される場合には、フレームワークを有しないか、又はげっ歯類起源のCDR残基を有するヒト抗体が得られる（1993年4月1日に公開された、PCT特許公開WO 93 / 06213号を参照。）。

10

20

30

40

【0175】

アレイ

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体EGFrポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体EGFrポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドと相補的な1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体PI3Kポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体PI3Kポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドと相補的な1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体B-Rafポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体B-Rafポリペプチドをコードする1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドと相補的な1つ又はそれ以上のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイが提供される。

【0176】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体EGFrポリヌクレオチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体EGFrポリヌクレオチドの量がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定の実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体EGFrポリヌクレオチドの量に影響を与える能力も評価される。

【0177】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体PI3Kポリヌクレオチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体PI3Kポリヌクレオチドの量がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定の実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体PI3Kポリヌクレオチドの量に影響を与える能力も評価される。

50

【 0 1 7 8 】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリヌクレオチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリヌクレオチドの量がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリヌクレオチドの量に影響を与える能力も評価される。

【 0 1 7 9 】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定のこのような実施形態において、mRNAは、まず、細胞又は組織試料から抽出され、続いて、cDNAへと変換され、これがマイクロアレイにハイブリッド形成される。特定のこのような実施形態において、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの存在又は不存在は、変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在の指標である。特定のこのような実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの発現レベルは、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの量を定量することによって評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの発現に影響を与える能力も評価される。

10

20

【 0 1 8 0 】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定のこのような実施形態において、mRNAは、まず、細胞又は組織試料から抽出され、続いて、cDNAへと変換され、これがマイクロアレイにハイブリッド形成される。特定のこのような実施形態において、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの存在又は不存在は、変異体 P I 3 K ポリペプチドの存在又は不存在の指標である。特定のこのような実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現レベルは、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの量を定量することによって評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの発現に影響を与える能力も評価される。

30

【 0 1 8 1 】

特定の実施形態において、2つ又はそれ以上の細胞又は組織試料中の1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの存在又は不存在がマイクロアレイ技術を用いて評価される。特定のこのような実施形態において、mRNAは、まず、細胞又は組織試料から抽出され、続いて、cDNAへと変換され、これがマイクロアレイにハイブリッド形成される。特定のこのような実施形態において、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの存在又は不存在は、変異体 B - R a f ポリペプチドの存在又は不存在の指標である。特定のこのような実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの発現レベルは、マイクロアレイに特異的に結合されたcDNAの量を定量することによって評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織は評価前に処理され、この処理が1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの発現に影響を与える能力も評価される。

40

【 0 1 8 2 】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドを含むマイクロアレイが提供される（例えば、M c B e a t h e t a l . , S c i e n c e , 289 : 1760 - 1763 , 2000 参照）。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドに対する候補特異的結合因子は、変異体 E G F r ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定の実施形態において、変異体

50

E G F r ポリペプチドの活性を調節するための候補化合物は、変異体 E G F r ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が評価される。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化を増加する能力が評価される。

【0183】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドを含むマイクロアレイが提供される（例えば、McBeath et al., Science, 289: 1760 - 1763, 2000 参照）。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する候補特異的結合因子は、変異体 P I 3 K ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性を調節するための候補化合物は、変異体 P I 3 K ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 P I 3 K ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が評価される。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 P I 3 K ポリペプチドの自己リン酸化を増加する能力が評価される。

10

【0184】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドを含むマイクロアレイが提供される（例えば、McBeath et al., Science, 289: 1760 - 1763, 2000 参照）。特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドに対する候補特異的結合因子は、変異体 B - R a f ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドの活性を調節するための候補化合物は、変異体 B - R a f ポリペプチドマイクロアレイを用いてスクリーニングされる。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 B - R a f ポリペプチドの自己リン酸化を減少又は抑制する能力が評価される。特定のこのような実施形態において、候補化合物が変異体 B - R a f ポリペプチドの自己リン酸化を増加する能力が評価される。

20

【0185】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドに対する1つ又はそれ以上の特異的結合因子を含むマイクロアレイが提供される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在が評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチドの量が評価される。

30

【0186】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドに対する1つ又はそれ以上の特異的結合因子を含むマイクロアレイが提供される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの存在又は不存在が評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 P I 3 K ポリペプチドの量が評価される。

【0187】

特定の実施形態において、1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドに対する1つ又はそれ以上の特異的結合因子を含むマイクロアレイが提供される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの存在又は不存在が評価される。特定のこのような実施形態において、細胞又は組織中の1つ又はそれ以上の変異体 B - R a f ポリペプチドの量が評価される。

40

【0188】

特定の方法

特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドを結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドを結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される

50

。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドを結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドを動物に投与すること及び少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドを結合することが可能な抗体を前記動物から取得することを含む、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドを結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドを動物に投与すること及び少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドを結合することが可能な抗体を前記動物から取得することを含む、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドに結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドを動物に投与すること及び少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドを結合することが可能な抗体を前記動物から取得することを含む、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドに結合することが可能な抗体を取得する方法が提供される。特定のこのような実施形態において、抗体はヒト抗体である。

10

20

30

40

50

【0189】

特定の実施形態において、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを結合できる抗体を取得する方法であり、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つの配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを動物に投与すること、並びに配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを結合できる抗体を前記動物から取得することを含む前記方法が提供される。特定のこのような実施形態において、抗体はヒト抗体である。

【0190】

特定の実施形態において、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドを結合できる抗体を取得する方法であり、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つの配列を含む少なくとも1つのポリペプチドの少なくとも1つの断片を動物に投与すること（前記少なくとも1つの断片は少なくとも1つの変異を含む。）、並びに配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含む少なくとも1つのポリペプチドに結合できる抗体を前記動物から取得することを含む前記方法が提供される。特定のこのような実施形態において、抗体はヒト抗体である。

【0191】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上の E G F r 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上の P I 3 K 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上の B - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断す

る方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体EGFrポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体EGFrポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

10

【0192】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12及び配列番号13から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、及び(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12及び配列番号13から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、及び(b)前記ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

20

【0193】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体PI3Kポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体PI3Kポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

30

【0194】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号15、配列番号16及び配列番号17から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号15、配列番号16及び配列番号17から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

40

50

【0195】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体B - R a f ポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体B - R a f ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

10

【0196】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連する疾病又は症状を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB - R a f 変異に関連した疾病又は症状を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

20

【0197】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状に対する感受性を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体E G F r ポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体E G F r ポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

30

【0198】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中での、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12及び配列番号13から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のE G F r 変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中での、配列番号2、配列番号3、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号12及び配列番号13から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基

40

50

づいて、1つ又はそれ以上のEGFr変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

【0199】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体PI3Kポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体PI3Kポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

10

【0200】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中での、配列番号15、配列番号16及び配列番号17から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中での、配列番号15、配列番号16及び配列番号17から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のPI3K変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

20

【0201】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法が提供される。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体B-Rafポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)対象から得られた試料中での、変異体B-Rafポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

30

40

【0202】

特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むポリペプチドの発現の存在又は量を測定すること、並びに(b)前記ポリペプチドの発現の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、対象中の1つ又はそれ以上のB-Raf変異に関連する疾病又は症状への感受性を診断する方法は、(a)前記対象から得られた試料中の、配列番号19及び配列番号20から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を

50

コードするポリヌクレオチドの転写又は翻訳の存在又は量を測定すること、並びに (b) 前記ポリヌペプチドの転写又は翻訳の存在又は量に基づいて、1つ又はそれ以上の B - R a f 変異に関連した疾病又は症状への感受性を診断することを含む。特定の実施形態において、前記疾病又は症状は癌である。

【0203】

特定の実施形態において、変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、試料中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 E G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも1つの E G F r 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、試料中の変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 E G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも1つの E G F r 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 E G F r ポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む。

10

20

【0204】

特定の実施形態において、変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、試料中の変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 P I 3 K ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、E 5 4 2 K、E 5 4 5 A 及び H 1 0 4 7 L から選択される少なくとも1つの P I 3 K 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、試料中の変異体 P I 3 K ポリペプチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 P I 3 K ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、E 5 4 2 K、E 5 4 5 A 及び H 1 0 4 7 L から選択される少なくとも1つの P I 3 K 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。

30

【0205】

特定の実施形態において、変異体 B - R a f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法が提供される。特定の実施形態において、試料中の変異体 B - R a f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 B - R a f ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、V 6 0 0 E 及び K 6 0 1 E から選択される少なくとも1つの B - R a f 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 B - R a f ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在又は不存在を測定することを含む。特定の実施形態において、試料中の変異体 B - R a f ポリペプチドの存在又は不存在を測定する方法は、(a) 変異体 B - R a f ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブに試料を曝露すること (前記領域は、V 6 0 0 E 及び K 6 0 1 E から選択される少なくとも1つの B - R a f 変異を含む。)、並びに (b) 前記試料中の変異体 B - R a f ポリペプチドの存在又は不存在を測定することを含む。

40

【0206】

50

特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法は、変異体 E G F r ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現する細胞を検査化合物に接触させること、及び前記検査化合物が変異体 E G F r ポリペプチドの活性を調節するかどうかを検出することを含む。特定のこのような実施形態において、検査化合物は E G F r ポリペプチドの活性を増加させる。特定のこのような実施形態において、検査化合物は E G F r ポリペプチドの活性を減少させる。特定のこのような実施形態において、E G F r ポリペプチドの活性を減少させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。特定のこのような実施形態において、E G F r ポリペプチドの活性を増加させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 E G F r ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。

10

【0207】

特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法は、変異体 P I 3 K ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現する細胞を検査化合物に接触させること、及び前記検査化合物が変異体 P I 3 K ポリペプチドの活性を調節するかどうかを検出することを含む。特定のこのような実施形態において、検査化合物は P I 3 K ポリペプチドの活性を増加させる。特定のこのような実施形態において、検査化合物は P I 3 K ポリペプチドの活性を減少させる。特定のこのような実施形態において、P I 3 K ポリペプチドの活性を減少させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。特定のこのような実施形態において、P I 3 K ポリペプチドの活性を増加させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 P I 3 K ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。

20

【0208】

特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドの活性の調節物質をスクリーニングする方法は、変異体 B - R a f ポリペプチドをコードする少なくとも1つのポリヌクレオチドを発現する細胞を検査化合物と接触させること、及び前記検査化合物が変異体 B - R a f ポリペプチドの活性を調節するかどうかを検出することを含む。特定のこのような実施形態において、検査化合物は B - R a f ポリペプチドの活性を増加させる。特定のこのような実施形態において、検査化合物は B - R a f ポリペプチドの活性を減少させる。特定のこのような実施形態において、B - R a f ポリペプチドの活性を減少させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。特定のこのような実施形態において、B - R a f ポリペプチドの活性を増加させることが同定された検査化合物は、少なくとも1つの変異体 B - R a f ポリペプチドに関連する疾病又は症状を治療するために使用することが可能である。

30

40

【0209】

特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供され、本方法は、

(a) 対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも1つの E G F r 変異を検出すること (少なくとも1つの E G F r 変異の検出は、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を発症することに対して、患者が増加した感受性を有することを示す。) 、 及び

50

(b) 変異体 E G F r ポリペプチドを特異的に結合する抗体を前記対象に投与することを含む。

【0210】

特定のこのような実施形態において、抗体はヒト抗体である。特定のこのような実施形態において、抗体はパニツムマブ又はその抗原結合領域である。

【0211】

特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供され、本方法は、

(a) 対象から得られたポリヌクレオチド中の少なくとも1つの E G F r 変異を検出すること(少なくとも1つの E G F r 変異の検出は、患者が少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状を有することを示す。)、及び

(b) 変異体 E G F r ポリペプチドを特異的に結合する抗体を前記対象に投与することを含む。

【0212】

特定のこのような実施形態において、抗体はヒト抗体である。特定のこのような実施形態において、抗体はパニツムマブ又はその抗原結合領域である。

【0213】

特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供され、前記 E G F r 変異の少なくとも1つは L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される。

【0214】

特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供され、ここにおいて、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状は非小細胞肺癌である。

【0215】

特定の実施形態において、少なくとも1つの E G F r 変異に関連する疾病又は症状に対して対象を治療する方法が提供され、このような治療を必要とする対象に、変異体 E G F r ポリヌクレオチドに対してアンチセンスのポリヌクレオチドを投与することを含む。

【0216】

特定の実施形態において、個体の特異的集団において、変異体 E G F r 集団プロファイルを確認する方法が提供され、(a) 集団中の個体の遺伝的プロファイル中に少なくとも1つの E G F r 変異の存在を測定すること、並びに(b) 変異体 E G F r 遺伝的プロファイルと前記個体との関係を確認することを含む。特定のこのような実施形態において、個体の特異的特徴は、E G F r 変異に関連する疾病又は症状を発症することに対する感受性を含む。特定のこのような実施形態において、個体の特異的特徴は、E G F r 変異に関連する疾病又は症状を呈することを含む。

【0217】

特定の実施形態において、対象中の疾病又は症状に対するゲフィチニブ治療の効力を予測する方法が提供され、対象の変異体 E G F r ポリペプチド中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在又は不存在を測定することを含み、ここにおいて、1つ又はそれ以上の変異体 E G F r ポリペプチド中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在は、ゲフィチニブを用いた治療に対する耐性を示す。

【0218】

特定の実施形態において、癌に罹患する対象中の抗 E G F r 抗体を用いた治療に対する応答性を測定する方法が提供され、対象中の E G F r 変異 T 7 9 0 M の存在又は不存在を測定することを含む。特定のこのような実施形態において、抗体はパニツムマブ又はセツキシマブである。

【0219】

特定の実施形態において、対象中の変異体 E G F r ポリペプチドをコードするポリヌク

10

20

30

40

50

レオチドを検出するためのキットが提供される。特定のこのような実施形態において、本キットは、変異体 R G F r ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドにハイブリッド形成するプローブを含み、前記領域は、L 6 8 8 P、Q 7 0 1 H、K 7 4 5 N、C 7 8 1 R、アミノ酸 7 7 1 と 7 7 2 の間のヒスチジン挿入、T 7 9 0 M、L 8 2 8 停止、Q 8 4 9 R、F 9 1 0 L 及び V 9 4 8 A から選択される少なくとも 1 つの E G F r 変異を含む。特定の実施形態において、本キットは、2 つ又はそれ以上の増幅プライマーをさらに含む。特定の実施形態において、本キットは、検出成分をさらに含む。特定の実施形態において、本キットは、核酸試料作製要素をさらに含む。

【 0 2 2 0 】

実施された実験及び達成された結果を含む以下の実施例は、例示の目的のためのみに提供されており、本発明を限定するものと解釈すべきでない。

10

【 0 2 2 1 】

実施例

【 実施例 1 】

【 0 2 2 2 】

非小細胞肺癌及び結腸直腸腺癌腫瘍試料中での E G F R、P I 3 K 及び B - R a f 変異の同定

非小細胞肺癌腫 (「 N S C L C 」) に伴う E G F r、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (「 P I 3 K 」) 及び B - R a f 中の変異を同定するために、E G F r、P I 3 K 及び B - R a f の特異的エキソンは、N S C L C 腫瘍試料から単離及び増幅された。化学療法及び / 又はパニツムマブによる患者の治療の前に、化学療法治療単独 (カルボプラチン / パクリタキセル) と、ヒト抗 E G F r 抗体 (A m g e n) パニツムマブと組み合わされた化学療法治療とを比較する第一次 N S C L C 試験に参加した 2 0 人の患者から得た二重盲検腫瘍試料を得た。結腸直腸腺癌 (「 C R C 」) に伴う E G F r 及び P I 3 K 中の変異を同定するために、2 0 人の C R C 患者の腫瘍から E G F r 及び P I 3 K の特異的エキソンを単離及び増幅した。化学療法及び / 又はパニツムマブによる患者の治療の前に、化学療法治療単独 (カルボプラチン / パクリタキセル) と、ヒト抗 E G F r 抗体 (A m g e n) であるパニツムマブと組み合わされた化学療法治療とを比較する第一次 C R C 試験に参加した 2 0 人の患者から得た二重盲検腫瘍試料を得た。これらのエキソンに対する野生型配列由来の何れかの変化を同定するために、単離された各エキソンを配列決定した。

20

30

【 0 2 2 3 】

2 0 人の患者から得られた N S C L C 腫瘍試料 (表 1) 及び 2 0 人の患者から得られた C R C 腫瘍試料 (表 2) を集めた。腫瘍の E G F r 発現の量を特定するために各腫瘍試料の一部を染色し、3 点のスケールで (3 が染色の最大の程度である。) 染色をランク付けした。各腫瘍試料の少なくとも 1 0 % は、3 又はそれ以上の染色レベルを示した。ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の巨視的解剖により、隣接する正常な組織、壊死片及び間質から腫瘍組織を分離した。整えられた試料を顕微鏡スライド上に固定し、室温で保存した。

【 0 2 2 4 】

40

【表 1】

表 1 : NSCLC 患者の試料

組織学番号	患者番号	臨床試験患者番号
04H-361 JH-2	16914	4146
04H-362 JLM-2	16917	4178
04H-366 JKH-1	16928	4103
04H-368 DC-2	16935	4133
04H-370 WRW-2	16941	4140
04H-423 GHB S-1	17093	4113
04H-453 DSP S-1	17183	4130
04H-487 MMH S-1	17255	4118
04H-488 NSP S-1	17258	4121
04H-489 JDE S-1	17261	4135
04H-496 BAH S-1	17282	4161
04H-499 JMW S-1	17291	4143
04H-511 LRR S-1	17327	4182
04H-512 GLP S-1	17330	4183
04H-523 RLL S-1	17363	4116
04H-524 FPJ S-1	17366	4120
04H-525 DJK S-1	17369	4122
04H-526 JMS S-1	17372	4129
04H-593 KMW-1	17891	4101
04H-595 REG-1	17897	4123

10

20

30

【 0 2 2 5 】

【表 2】

表 2 : C R C 患者の試料

組織学番号	患者番号	臨床試験患者番号
04H-537 MLB S-1	17380	9006
04H-538 TAO S-1	17383	9021
04H-540 RRK S-1	17389	9001
04H-541 HJB S-1	17392	9002
04H-542 PJW-1	17395	9003
04H-543 JWJ S-1	17398	9004
04H-546 RFH S-1	17407	9011
04H-547 WCD S-1	17410	9014
04H-548 LKW S-1	17413	9024
04H-550 DGA S-1	17419	9038
04H-551 TLR S-1	17422	9020
04H-552 KS S-1	17425	9037
04H-556 MJJ S-1	17437	9015
04H-557 MLR S-1	17440	9034
04H-559 PH S-1	17446	9040
04H-563 AMF S-1	17458	9033
04H-565 RCR S-1	17464	9029
04H-566 GC S-1	17467	9039
04H-567 GWB S-1	17470	9013
04H-568 HLB S-1	17473	9019

【 0 2 2 6 】

製造業者のプロトコールに従い、Pinpoint Slide DNA Isolation System (Zymo Research, Orange, CA) を用いて、試料スライドからゲノムDNAを調製した。最終の単離されたゲノムDNA産物を、500 μ L の水中に溶解した。各エキソンに対して特異的なプライマーを用いるPCRによって、ヒトEGFRのエキソン18、19、20、21及び23、ヒトPI3Kのエキソン9及び20並びにヒトB-Rafのエキソン15に対応する配列を増幅した。野生型EGFR cDNA配列中の各エキソンに対するイントロン配列5'及び3'を用いて、各エキソンに対するプライマー配列を設計した (Genbank 受託番号AC006977; 配列番号55)。ゲノム野生型EGFRヌクレオチド配列は、Genbank 受託番号AC073324で見出される。野生型EGFRポリペプチド配列は、Genbank 受託番号AAS83109 (配列番号1) で見出される。EGFRエキソン18に対するフォワードプライマーは、5' - GGG CCA TGT CTG GCA CTG CT T TCC - 3' (配列番号22) であり、EGFRエキソン18に対するリバースプラ

イマーは、5' - G A A A T A T A C A G C T T G C A A G G A C T C - 3' (配列番号23)であった。E G F rエキソン19に対するフォワードプライマーは、5' - A A T A T C A G C C T T A G G T G C G G C T C C - 3' (配列番号24)であり、E G F rエキソン19に対するリバープライマーは、5' - G A G A A A A G G T G G G C C C T G A G G T T C - 3' (配列番号25)であった。E G F rエキソン20に対するフォワードプライマーは、5' - C T G C G T A A A C G T C C C T G T G C T A G G T C - 3' (配列番号26)であり、E G F rエキソン20に対するリバープライマーは、5' - G C A C G C A C A C A C A T A T C C C C A T G G C - 3' (配列番号27)であった。E G F rエキソン21に対するフォワードプライマーは、5' - G C A T G A A C A T G A C C C T G A A T T C G G - 3' (配列番号28)であり、E G F rエキソン21に対するリバープライマーは、5' - C C T G C A T G T G T T A A A C A A T A C A G C - 3' (配列番号29)であった。E G F rエキソン23に対するフォワードプライマーは、5' - T C A T T C A T G A T C C C A C T G C C T T C - 3' (配列番号30)であり、E G F rエキソン23に対するリバープライマーは、5' - C A G C T G T T T G G C T A A G A G C A G C C - 3' (配列番号31)であった。

【0227】

野生型 P I 3 Kポリペプチド配列は、G e n b a n k 受託番号 U 7 9 1 4 3 (配列番号14)で見出される。野生型 P I 3 K c D N A 配列は、図7 (配列番号58)に示されている。P I 3 Kエキソン9に対するフォワードプライマーは、5' - C T G T A A A T C A T C T G T G A A T C C A G A G G G G - 3' (配列番号32)であり、P I 3 Kエキソン9に対するリバープライマーは、5' - G T A A A T T C T G C T T T A T T T A T T C C A A T A G G T A T G G - 3' (配列番号33)であった。P I 3 Kエキソン20に対するフォワードプライマーは、5' - C T A C G A A A G C C T C T C T A A T T T T G T G A C A T T T G A G C - 3' (配列番号34)であり、P I 3 Kエキソン20に対するリバープライマーは、5' - C T T G C T G T A A A T T C T A A T G C T G T T C A T G G A T T G T G C - 3' (配列番号35)であった。野生型 B - R a fポリペプチド配列は、G e n b a n k 受託番号 N M 0 0 4 3 3 3 (配列番号18)で見出される。野生型 B - R a f c D N A 配列は、図8 (配列番号60)に示されている。B - R a fエキソン11に対するフォワードプライマーは、5' - G G G G A T C T C T T C C T G T A T C C C T C T C A G G C - 3' (配列番号36)であり、B - R a fエキソン11に対するリバープライマーは、5' - G T T T A T T G A T G C G A A C A G T G A A T A T T T C C - 3' (配列番号37)であった。B - R a fエキソン15に対するフォワードプライマーは、5' - C A T A A T G C T T G C T C T G A T A G G - 3' (配列番号38)であり、B - R a fエキソン15に対するリバープライマーは、5' - G T A A C T C A G C A G C A T C T C A G - 3' (配列番号39)であった。

【0228】

T a q DNAポリメラーゼ (R o c h e D i a g n o s t i c s C o r p) 及び以下の条件を用いて P C R を行った。10×T a q 緩衝液 5 μ L、24 mM の M g C l₂ 0.5 μ L、ゲノムDNA (約 0.5 ng) 1 μ L、2.5 mM の d N T P s 7 μ L、T a q ポリメラーゼ (5 U) 1 μ L 及び 29.5 μ L の d d H₂O を合わせて、混合した。合わせたプライマー原液 (それぞれ 10 μ M) 6 μ L を各チューブに添加した。サイクルプロトコールは、93 で4分を1サイクル、93 で10秒、62 で30秒、72 で30秒を35サイクル、72 で4分を1サイクルであった。反応の終了時に、温度を4 に維持した。

【0229】

各個別のエキソンに対する P C R 産物をプールし、ゲル精製した。製造業者の指示書に

10

20

30

40

50

従って、TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Corp) を用いて、精製され増幅されたエキソン配列をpCR2.1ベクター中にサブクローニングした。Genetix Colony Pickerによって、ベクター及び目的の挿入エキソンを含有するE.コリコロニーを選択した。液体培地中で、これらのコロニーを一晩増殖させた。製造業者の指示書に従って、QIAGEN 9600、3000又は8000 Bio-robot (Qiagen) を用いて、各一晩細菌培養から得られたプラスミドDNAを単離した。

【0230】

製造業者の指示書に従い、BigDye 3.1 Terminator Kit (Applied Biosystems, Inc.) を用いて、各エキソンを含有する単離されたプラスミドDNAを配列決定した。3700、3100又は3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.) を用いて配列決定データを集め、Sequencher program (GeneCodes Corp.) を用いて分析した。患者試料から得られたエキソン配列を野生型エキソン配列と比較した。結果は、図1及び2に模式的に示されている。

10

【0231】

NSCLC患者腫瘍試料の変異分析(図1)によって、EGFR中に以下の幾つかの変異が同定された。2人の異なる患者中にEGFRのエキソン18中の2つの異なる変異(Q701H(配列番号40、配列番号3のポリペプチドをコードする。))及びL688P(配列番号41、配列番号2のポリペプチドをコードする。))、2人の異なる患者中にEGFRのエキソン19中の15塩基対の欠失(配列番号42、配列番号4のポリペプチドをコードする。))及び変異(K745N(配列番号43、配列番号5のポリペプチドをコードする。))、3人の異なる患者中にEGFRのエキソン20中の3つの異なる変異(C781R(配列番号44、配列番号6のポリペプチドをコードする。))、T790M(配列番号45、配列番号8のポリペプチドをコードする。))及びアミノ酸771と772の間のヒスチジン挿入(配列番号46、配列番号7のポリペプチドをコードする。))、単一の患者中にEGFRのエキソン21中の1つの変異(Q849R(配列番号47、配列番号10のポリペプチドをコードする。))並びに2つの異なる患者中のEGFRのエキソン23中の2つの異なる変異(V948A(配列番号48、配列番号13のポリペプチドをコードする。))及びF910L(配列番号49、配列番号12のポリペプチドをコードする。))。NSCLC患者試料中のPI3Kエキソンの分析によって、7人の異なる患者中に観察されたPI3Kのエキソン9中に単一の変異(E545A(配列番号50、配列番号16のポリペプチドをコードする。))を同定し、PI3Kのエキソン20中には変異を同定しなかった。B-Rafエキソン15の分析も、2人の異なる患者中に単一の変異(V600E(配列番号51、配列番号19のポリペプチドをコードする。))を同定した。

20

30

【0232】

これに対して、CRC患者の腫瘍試料の変異分析は、20人のCRC患者中にはEGFRの変異を一切同定しなかった(図2)。20人の患者のうち13人が、NSCLC患者試料中に以前に同定されたPI3Kのエキソン9中に同一のE545A変異(配列番号50、配列番号16のポリペプチドをコードする。)を有していた。さらに、このエキソン中に、3人の他の患者中に変異E542K(配列番号53、配列番号15のポリペプチドをコードする。))が同定された。単一の患者において、PI3Kのエキソン20中に1つの変異(H1047L(配列番号54、配列番号17のポリペプチドをコードする。))が同定された。

40

【0233】

このように、12の異なるEGFR変異、1つのPI3K変異及び1つのB-Raf変異がNSCLC患者の腫瘍試料中に同定された一方で、CRC患者の腫瘍試料中には、3つのPI3K変異が同定され、EGFR変異は同定されなかった。

【実施例2】

50

【 0 2 3 4 】

拡張された非小細胞肺癌腫変異分析

39人のさらなるNSCLC患者腫瘍試料の拡張された変異研究を行った。化学療法及び/又はパニツムマブによる患者の治療の前に、化学療法治療単独（カルボプラチン/パクリタキセル）と、ヒト抗EGFr抗体（Amgen）であるパニツムマブと組み合わされた化学療法治療とを比較する第一次NSCLC試験に参加した39人の患者から得た二重盲検腫瘍試料を得た。実施例1に記載されている同一のDNA単離、増幅、サブクロニング及び分析操作を用いて、変異の存在について、EGFrエキソン18、19、20、21及び23並びにB-Rafエキソン11及び15を分析した。39個の試料が表3に詳述されており、これらの試料の分析の結果は図3に示されている。

10

【 0 2 3 5 】

【表3】

表3：拡張された研究のためのNSCLC患者の試料

組織学番号	患者番号	臨床試験患者番号
04H-424 JAQ S-2	17096	4119
04H-425 JZ-2	17099	4228
04H-426 PAP-2	17102	4233
04H-427 SFD-2	17105	4239
04H-428 AMB S-2	17108	4167
04H-429 ELH S-2	17111	4273
04H-430 HDD S-2	17114	4144
04H-431 CMW S-2	17117	4213
04H-432 JL S-2	17120	4165
04H-433 RC S-2	17123	4170
04H-434 RZ S-2	17126	4219
04H-435 GK S-2	17129	4265
04H-436 RT S-2	17132	4248
04H-437 MMF S-2	17135	4240

20

30

04H-438 JDR S-2	17138	4179
04H-439 LC S-2	17141	4256
04H-440 GLP S-2	17144	4275
04H-441 MHR S-2	17147	4206
04H-442 JEF S-2	17150	4222
04H-443 HBA S-2	17153	4223
04H-444 DT S-2	17156	4231
04H-447 CD S-2	17165	4207
04H-449 DWB S-2	17171	4164
04H-450 DLR S-2	17174	4211
04H-454 NPJ S-2	17186	4136
04H-456 NEN S-2	17192	4151
04H-461 LWF S-2	17207	4218
04H-479 MAT S-2	17231	4229
04H-482 GPH S-2	17240	4221
04H-484 JP S-2	17246	4156
04H-493 JS S-2	17273	4208
04H-497 JMP S-2	17285	4189
04H-503 SAS S-2	17303	4254
04H-504 JDD S-2	17306	4152
04H-507 RWR S-2	17315	4157
04H-510 CSL S-2	17324	4180
04H-513 ALF S-2	17333	4205
04H-515 VIT S-2	17339	4149
04H-522 VAB S-2	17360	4257

10

20

30

40

50

【 0 2 3 6 】

分析の結果は、E G F r エキソン 2 0 又は 2 3 中に変異を同定しなかった。4 つの異なる患者試料中の E G F r エキソン 1 8 (L 6 8 8 P (配列番号 4 1、配列番号 2 のポリペプチドをコードする。)) 中に、単一の変異が同定された。単一の患者試料中に、E G F r エキソン 1 9 中の単一の 1 5 塩基対欠失 (配列番号 4 2、配列番号 4 のポリペプチドをコードする。) が同定された。それぞれ 2 人の異なる患者において、E G F r エキソン 2 1 (L 8 5 8 R (配列番号 6 1、配列番号 1 1 のポリペプチドをコードする。)) 及び L 8 2 8 停止 (配列番号 5 6、配列番号 9 のポリペプチドをコードする。)) 中に、2 つの変異が同定された。B - R a f エキソン 1 1 中には変異が同定されなかった。単一の患者試料中において、B - R a f のエキソン 1 5 中に 1 つの変異 K 6 0 1 E (配列番号 5 7、配列番号 2 0 のポリペプチドをコードする。)) が同定された。観察された変異のうち、2 つが、実施例 1 において既に同定されており (E G F r エキソン 1 8 中の L 6 8 8 P 及び

E G F r エキソン 19 中の 15 塩基対の欠失)、3 つが新たに同定された (E G F エキソン 21 中の L 8 5 8 R 及び L 8 2 8 停止並びに B - R a f エキソン 15 中の K 6 0 1 E)。E G F r 遺伝子中の合計 9 つの確認された変異が 8 人の N S C L C 患者試料中に同定され、B - R a f 遺伝子中の 1 つの確認された変異が 1 人の N S C L C 患者中に同定された。

【実施例 3】

【0237】

変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化能の分析

典型的には、E G F r は、E G F 又は T G F - α などのリガンドへの結合時に、内部移行への前駆体として自己リン酸化現象を経験する。従って、インビトロでの E G F 誘導性 E G F r リン酸化の阻害を測定するために、実施例 2 で同定された特定の E G F r 変異体ポリペプチドを研究した。

【0238】

野生型 (配列番号 1) 又は変異された E G F r ポリペプチドを過剰発現するチャイニーズハムスター卵巣細胞株が構築された。各株からの細胞を播種し、E G F での刺激前に、パニツムマブ又はゲフィチニブ (I r e s s a ^{T M}、4 - キナゾリンアミン、N - (3 - クロロ - 4 - フルオロフェニル) - 7 - メトキシ - 6 - [3 - 4 - (モルホリン)プロボキシ]、小分子キナーゼ阻害剤) の何れか 0 ~ 2 μ M で処理した。E G F 誘導性自己リン酸化に対する I C ₅₀ は、ゲフィチニブ及びパニツムマブ処理された試料に対して計算された (表 4)。野生型 E G F r 及び T 7 9 0 M 変異体 E G F r ポリペプチドに対する生の電気泳動データが図 4 に示されている。

【0239】

【表 4】

表 4 : ゲフィチニブ又はパニツムマブでの治療後の

E G F r 自己リン酸化に対する I C 5 0

E G F r 変異	ゲフィチニブ 前処理 I C 5 0 (nM)	パニツムマブ 前処理 I C 5 0 (nM)
なし (野生型)	14.6	0.23
エキソン 19 中の 15 塩基 対欠失	1.4	0.17
エキソン 21 中の L858R	3.2	0.18
エキソン 20 中の T790M	>5000	0.23

【0240】

表 4 に示されているように、野生型 E G F r 及び 15 塩基対の欠失及び L 8 5 8 R E G F r 変異体に対して、低濃度の E G F r 自己リン酸化を抑制する上で、ゲフィチニブ及びパニツムマブの両方が有効であった。しかしながら、ゲフィチニブ (I C 5 0 > 2 0 0 0 nM) によって、T 7 9 0 M 変異体 E G F r ポリペプチドの自己リン酸化は阻害されなかったが、パニツムマブ (0 . 2 3 nM の I C 5 0) によって効果的に阻害された。従って、パニツムマブは、E G F r エキソン 20 中に T 7 9 0 M 変異を有する N S C L C 患者に対して、ゲフィチニブより有効な処置であり得る。

【実施例 4】

【0241】

変異分析のパニツムマブ効果との相関

実施例 2 の変異分析後、変異が観察された患者について研究の結果を非盲検とした (表 5)。腫瘍サイズに基づいて、安定な疾病又は進行性の疾病の改善を特定するためのガイ

ドラインを提供する固形腫瘍における応答評価基準 (RECIST) を用いて、6 週毎に、調査者によって臨床データを評価した (Therasse et al., February 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92(3):205-216 を参照)。

【0242】

【表5】

表5：NSCLC患者試料

同定された変異	性別	喫煙歴	治療	3 又はそれ以上の 染色レベルを有 する%EGFr	応答
15 塩基対欠失エクソン 19	男性	なし	化学療法	60	安定な疾病
L688P エクソン 18	女性	以前	化学療法	50	安定な疾病
L688P エクソン 18	男性	以前	化学療法	80	部分的応答
L688P エクソン 18	男性	以前	化学療法	10	安定な疾病
T790M エクソン 20	男性	以前	化学療法＋ パニツムマブ	10	安定な疾病
L858R エクソン 21	男性	以前	化学療法＋ パニツムマブ	90	安定な疾病
Q701H エクソン 18	女性	なし	化学療法＋ パニツムマブ	20	進行性の疾病
15 塩基対欠失エクソン 19	女性	なし	化学療法＋ パニツムマブ	40	部分的応答

10

20

30

【0243】

結果は、化学療法と組み合わせたパニツムマブが、EGFr エクソン 20 中の T790M 変異及び EGFr エクソン 21 中の L858R 変異を有する患者に対して、少なくとも 12 週間、安定な疾病をもたらすことを、示している。化学療法 / パニツムマブ併用療法を用いると、EGFr エクソン 19 中の 15 塩基対欠失を有する患者中に部分的な応答が観察された。これに対して、EGFr エクソン 19 中に同じ 15 塩基対欠失を有する患者は、化学療法処置のみで、安定な疾病を達成するに過ぎなかった。

【0244】

最近の研究は、EGFr チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブ (IressaTM (AstraZeneca) 及びエルロチニブ (TarcevaTM (Genentech)、N-(3-エチルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)-4-キナゾリナミン) に対して感受性を示す、NSCLC 由来の腫瘍中に幾つかの EGFr 変異を同定した。Lynchら (2004, "Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib," New England J. Med. 350(21):2129-39) は、以下の EGFr 変異：アミノ酸 746-753 領域中の欠失、L858R、L861Q 及び G719C が、ゲフィチニブによる処理に対する、NSCLC 患者腫瘍の感受性と関連することを見出した。

40

50

Paezら(2004, "EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy," Science 304:1497-1500)は、Lynchらと同様の知見を有し、EGFR変異L858R、G719S及びアミノ酸746と759の間の様々な欠失変異を有する腫瘍を、ゲフィチニブによる治療に対して感受性があると同定した。Paorら2004("EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(36):13306-13311)は、類似のEGFR変異(E746-A750欠失、L747-S752欠失、L858R及びR776C/L858R)がゲフィチニブ又はエルロチニブによる治療に対するNSCLC腫瘍の感受性と関連することを見出した。

10

【0245】

これらの研究と同様、実施例1及び2に論述されている研究も、NSCLC腫瘍を伴うEGFR変異として、エキソン19中の15塩基対欠失変異体及びエキソン21中のL858Rを同定した。非盲検化された患者の転帰が利用可能なデータのうち、これらの2つの変異又はT790Mの何れかを含有する腫瘍は、化学療法と組み合わせたパニツムマブによって阻害された。しかしながら、T790M変異は、ゲフィチニブ/エルロチニブ実験において以前に同定されなかった。インビトロ研究は、T790M EGFR変異体の自己リン酸化はパニツムマブの極めて低濃度で効果的に阻害されるのに対して、ゲフィチニブはこの変異体EGFRの自己リン酸化の効果的阻害剤ではないことを示す。従って、パニツムマブ併用療法は、T790M EGFR変異体に対する効果的な治療であり得るが、ゲフィチニブは効果的な治療ではあり得ない。

20

【0246】

他の実施形態は、明細書の検討及び本明細書に開示されている本発明の実施から当業者に自明である。明細書及び実施例は、典型的なものに過ぎないと考えられ、本発明の真の範囲及び精神は、以下の特許請求の範囲によって示されるものとする。

【0247】

パニツムマブ第2相NSCLC臨床試験から得られたEGFR体細胞遺伝子変異の同定及び前臨床性質決定：パニツムマブ感受性及びゲフィチニブ耐性を有する新規変異の発見 Freeman D,^{1*} Juan T,^{1*} Sarosi I,¹ Crawford J,² Sandler A,³ Schiller J,⁴ Prager D,⁵ Johnson D,³ Jerian S,¹ Radinsky R¹(*これらの著者は同等に寄稿した。),

30

¹Amgen Inc., Thousand Oaks, CA; ²Duke University Medical Center, Durham, NC; ³Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Nashville, TN; ⁴University of Wisconsin, Madison, WI; ⁵UCLA Medical Center, Los Angeles, CA

40

背景：EGFRチロシンキナーゼ阻害剤とモノクローナル抗体間の異なる機序を理解することは、EGFR経路及び臨床的な有益性をもたらすと思われる治療法に対する洞察を導き得る。完全なヒトモノクローナル抗体であり、EGFR細胞外ドメインに対して誘導されたパニツムマブは、現在、化学療法(カルボプラチン/パクリタキセル)と化学療法+パニツムマブを比較する第一次NSCLC試験において研究されている(n=175; 主要評価項目=無増悪期間)。EGFR遺伝子変異について、60人の患者を評価した。本研究の目的は、パニツムマブが、ゲフィチニブに比べて、新規EGFR変異に対して異なる活性を有するかどうかを決定することであった。

【0248】

50

方法：切開された F F P E 腫瘍切片（前処理）からゲノム DNA を単離した。E G F r 遺伝子エクソン 18、19、20、21 及び 23 に対して P C R を行い、P C R 産物をプールし、サブクローニングし、エクソン当り 30 を超えるコロニーの配列を決定し、G e n e t i c A n a l y z e r で分離した。その後の P C R 及びゲノム DNA 配列決定によって、変異の存在が確認された。これらのデータは、臨床結果データ（調査者は、6 週ごとに、R E C I S T によって評価した。）に関連付けられた。インビトロでの E G F 誘導性 E G F r 自己リン酸化の阻害を測定するために、W T 及び変異体 E G F r を過剰発現している C H O 細胞を、E G F 刺激の前に、パニツムマブ又はゲフィチニブの何れか 0 - 2 μ M で処理した。

【0249】

結果：60 人の N S C L C 患者が、8 人の患者中に 5 つの異なる体細胞 E G F r 遺伝子変異を示した。

【0250】

【表 6】

患者	性別	喫煙歴	治療	% EGFr (3+)	変異	応答*
1	男性	なし	化学療法	60	15 塩基対欠失エクソン 19	SD
2	女性	以前	化学療法	50	点変異エクソン 18	SD
3	男性	以前	化学療法	80	点変異エクソン 18	PR
4	男性	以前	化学療法	10	点変異エクソン 18	SD
5	男性	以前	化学療法＋ パニツムマブ	10	点変異エクソン 20	SD
6	男性	以前	化学療法＋ パニツムマブ	90	点変異エクソン 21	SD
7	女性	なし	化学療法＋ パニツムマブ	20	点変異エクソン 18	PD
8	女性	なし	化学療法＋ パニツムマブ	40	15 塩基対欠失エクソン 19	PR

* P R = 部分的応答、S D = 安定な疾病、P D = 進行性の疾病

【0251】

E G F r 野生型、エクソン 19 欠失、エクソン 21 点変異及び新規エクソン 20 変異の E G F 誘導性自己リン酸化に対する I C 50 は、ゲフィチニブで前処理された細胞については、14.6、1.4、3.2 及び > 2000 n M であり、パニツムマブで前処理された細胞については、0.23、0.17、0.18 及び 0.23 n M であった。

【0252】

結論：8 人の患者が、E G F r 体細胞遺伝子変異を有していた。E G F r を過剰発現している C H O 細胞において、パニツムマブは、変異の状態に関わらず、E G F 誘導性 E G F R 自己リン酸化を阻害した。エクソン 20 中の新規 E G F r 変異は、パニツムマブに対するインビトロ感受性、ゲフィチニブに対する耐性及びパニツムマブ＋化学療法での治療に応答して、2 サイクルにわたり（約 12 週間）、安定な疾病を経験した患者での臨床的有益性を伴う。

【0253】

パニツムマブ＋パクリタキセル及びカルボプラチン又は化学療法のみで治療された N S C L C 患者中の E G F r 遺伝子変異の分析

F r e e m a n D , ¹ * J u a n T , ¹ * S a r o s i I , ¹ C r a w f

10

20

30

40

50

ord J, ² Sandler A, ³ Schiller J, ⁴ Prager D, ⁵ Johnson D, ³ Moss S, ¹ Radinsky R ¹ (*これらの著者は同等に寄稿した。)、

¹ Amgen Inc., Thousand Oaks, CA; ² Duke University Medical Center, Durham, NC; ³ Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Nashville, TN; ⁴ University of Wisconsin, Madison, WI; ⁵ UCLA Medical Center, Los Angeles, CA

背景：パニツムマブは、上皮成長因子受容体 (EGFR) に対して誘導された完全なヒトモノクローナル抗体である。最近のデータは、非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の部分集団において、EGFR キナーゼドメイン中の体細胞遺伝子変異が小分子チロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性を伴うことを示唆している。パニツムマブ処理に対する患者の転帰とのEGFR遺伝子変異の関連性が存在すれば、これを決定するために、パクリタキセルとカルボプラチン (化学療法) とパニツムマブ + 化学療法の有効性と安全性を比較する無作為化された第2相研究に登録した60人のNSCLC患者の腫瘍中に、EGFR遺伝子を配列決定した。適格な患者は、段階IIIB / IV疾病及び免疫組織化学によって示されたところにより、腫瘍細胞の10%超に1+、2+又は3+のEGF発現を有する腫瘍を有していた。腫瘍応答は、RECIST基準を用いて、6週毎に、調査者によって評価された。本研究は登録を終え (n = 175)、治療が進行中である。

10

【0254】

20

方法：ホルマリン固定され、パラフィン包埋された組織切片の、光学顕微鏡下での解剖により、隣接する正常な組織、壊死片及び間質から腫瘍組織 (前処理) を分離した。ゲノムDNAを単離し、EGFR遺伝子のエキソン18、19、20、21及び23に対してPCRを行った。PCR産物をプールし、サブクローニングし、最低30個のコロニー / エキソン / 患者を分析した。その後のPCR及び精製されたゲノムDNAの配列決定を使用して、変異の存在を確認した。蛍光色素ターミネーター化学を用いてEGFRの変異分析を行い、Genetic Analyzer上で分割した。

【0255】

結果：60人のNSCLC患者のDNA配列決定によって、計8人の患者 (4人は化学療法治療群から及び4人の患者は化学療法 + パニツムマブ治療群から) 中に体細胞EGFR遺伝子変異が明らかとなった。

30

【0256】

【表 7】

患者	治療	% EGFr (3+)	変異	応答*
1	化学療法	60	15 塩基対欠失エキソン 19	SD
2	化学療法	50	点変異エキソン 18	SD
3	化学療法	80	点変異エキソン 18	PR
4	化学療法	10	点変異エキソン 18	SD
5	化学療法＋ パニツムマブ	10	点変異エキソン 20	SD
6	化学療法＋ パニツムマブ	90	点変異エキソン 21	SD
7	化学療法＋ パニツムマブ	20	点変異エキソン 18	PD
8	化学療法＋ パニツムマブ	40	15 塩基対欠失エキソン 19	PR

* P R = 部分的応答、S D = 安定な疾病、P D = 進行性の疾病

【0257】

結論：EGFr 体細胞遺伝子変異について、60 人の NSCLC 患者を評価した。8 人の患者が EGFr 遺伝子変異を有することが明らかとなり、3 人の患者はパニツムマブ＋化学療法により、部分的応答又は安定な疾病を有することが観察され、1 人の患者はパニツムマブ＋化学療法に対して応答しなかった。4 人の患者は、化学療法単独で、部分的応答又は安定な疾病を有することが観察された。60 人の患者の転帰が提示されている。

【図面の簡単な説明】

【0258】

【図 1】図 1 は、実施例 1 に記載されている作業に従って、20 人の患者から得られた非小細胞肺癌（「NSCLC」）腫瘍試料の変異分析を示す表である。各腫瘍のゲノム DNA から得られた EGFr エキソン 18、19、20、21 及び 23、PI3K エキソン 9 及び 20 並びに B-Raf エキソン 15 を増幅し、配列決定し、野生型 EGFr、PI3K 又は B-Raf 配列と比較した。

【図 2】図 2 は、実施例 1 に記載されている作業に従って、20 人の患者から得られた結腸直腸腺癌（「CRC」）腫瘍試料の変異分析を示す表である。各腫瘍のゲノム DNA から得られた EGFr エキソン 18、19、20、21 及び 23、PI3K エキソン 9 及び 20 並びに B-Raf エキソン 15 を増幅し、配列決定し、野生型 EGFr、PI3K 又は B-Raf 配列と比較した。

【図 3】図 3 は、実施例 2 に記載されている作業に従って、39 人の患者から得られた NSCLC 腫瘍試料の変異分析を示す表である。各腫瘍のゲノム DNA から得られた EGFr エキソン 18、19、20、21 及び 23 並びに B-Raf エキソン 11 及び 15 を増幅し、配列決定し、野生型 EGFr 又は B-Raf 配列と比較した。

【図 4】図 4 は、実施例 3 に記載されている作業に従った、野生型及び T790M EGFr 自己リン酸化に対するゲフィチニブ及びパニツムマブの阻害活性の放射性ゲル電気泳動分析を示す。

【図 5 A】図 5 は、対応する野生型配列との、特定の変異体 EGFr ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列並びに特定の PI3K ポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のアラインメントを示している。

【図 5 B】図 5 は、対応する野生型配列との、特定の変異体 EGFr ポリヌクレオチド及

【図 6 R】図 6 は、野生型及び変異体 E G F r 分子に対するポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を示している。

【図 8 F】図 8 は、野生型及び変異体 B - R a f 分子に対するポリヌクレオチド及びポリペプチド配列を示している。

40

【図 1】

FIGURE 1. NSCLC患者腫瘍試料の変異分析の結果

ATB #	EGFR E18	EGFR E19	EGFR E20	EGFR E21	EGFR E23	PIK3 E09	PIK3 E20	b-raf E15
16914	WT (9)	WT (21)	N.D.	WT (8)	WT (6)	TBD	TBD	TBD
16917	WT (11)	WT (12)	N.D.	WT (17)	WT (6)	TBD	TBD	TBD
16928	WT (8)	WT (38)	WT (14)	WT (46)	WT (17)	TBD	TBD	TBD
16935	WT (3)	WT (23)	C791R (9/25)	WT (36)	WT (48A) (12/20)	TBD	TBD	TBD
16941	WT (15)	WT (16)	N.D.	N.D.	N.D.	TBD	TBD	TBD
17093	WT (62)	WT (9)	EGFR E19 (2/22)	WT (2)	N.D.	TBD	TBD	TBD
17183	WT (88)	WT (45)	WT (7)	C949R (13/38)	WT (36)	TBD	TBD	TBD
17255	WT (80)	WT (36)	WT (66)	WT (12)	WT (21)	WT (8)	WT (2)	WT (9)
17258	WT (89)	WT (18)	WT (11)	WT (5)	WT (3)	WT (14)	N.D.	WT (82)
17261	WT (197)	WT (22)	N.D.	WT (8)	WT (12)	WT (15)	WT (2)	WT (16)
17282	WT (89)	WT (44)	WT (56)	WT (75)	WT (63)	WT (15)	WT (49)	WT (19)
17291	WT (96)	WT (23)	WT (62)	WT (25)	WT (23)	WT (3)	WT (19)	WT (6)
17327	WT (111/155)	WT (2)	WT (107)	WT (23)	WT (15)	WT (9)	N.D.	WT (6)
17330	WT (89)	WT (31)	WT (39)	WT (114)	WT (27)	WT (7)	WT (39)	WT (5)
17363	L688P (19/63)	L688P (15/26)	WT (40)	WT (24)	WT (21)	WT (29)	WT (33)	WT (5)
17366	WT (39)	WT (26)	WT (140)	WT (5)	WT (3)	WT (26)	N.D.	N.D.
17369	WT (128)	WT (22)	WT (34)	WT (29)	WT (45)	WT (4)	TBD	TBD
17372	WT (30)	WT (109)	WT (17)	WT (36)	WT (11)	WT (122)	WT (122)	WT (122)
17691	WT (34)	WT (6)	WT (43)	WT (128)	WT (128)	WT (128)	WT (128)	WT (128)
17697	WT (142)	WT (48)	WT (28)	WT (64)	WT (48)	WT (48)	WT (48)	WT (48)

【図 2】

FIGURE 2. CRC患者腫瘍試料の変異分析の結果

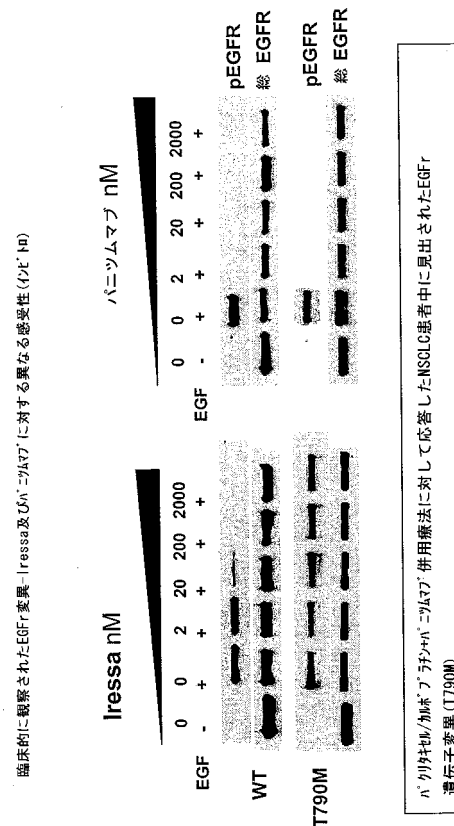
ATB #	EGFR E18	EGFR E19	EGFR E20	EGFR E21	EGFR E23	PIK3 E9	PIK3 E20	b-raf E15
17380	WT (67)	WT (113)	WT (109)	PCR産物なし	WT (34)	WT (101)	TBD	TBD
17383	WT (47)	WT (56)	WT (82)	WT (34)	WT (101)	WT (49)	TBD	TBD
17389	WT (78)	WT (41)	WT (208)	WT (17)	WT (39)	WT (7)	TBD	TBD
17392	WT (199)	WT (90)	WT (38)	WT (43)	WT (55)	WT (13)	TBD	TBD
17395	WT (225)	WT (191)	WT (191)	WT (19)	WT (5)	WT (8)	TBD	TBD
17398	WT (76)	WT (70)	WT (138)	WT (26)	WT (22)	WT (13)	TBD	TBD
17407	WT (94)	WT (8)	WT (57)	WT (45)	WT (6)	WT (4)	TBD	TBD
17410	WT (141)	WT (68)	WT (37)	WT (41)	WT (51)	WT (142)	TBD	TBD
17413	WT (143)	WT (29)	WT (43)	WT (33)	WT (17)	WT (16)	TBD	TBD
17419	WT (99)	WT (48)	WT (58)	WT (30)	WT (2)	WT (21)	TBD	TBD
17422	WT (77)	WT (77)	WT (56)	WT (34)	WT (23)	WT (10)	TBD	TBD
17425	WT (77)	WT (77)	WT (56)	WT (34)	WT (23)	WT (10)	TBD	TBD
17437	WT (93)	WT (20)	WT (48)	WT (38)	WT (54)	WT (8)	TBD	TBD
17440	WT (132)	WT (103)	WT (20)	WT (45)	WT (37)	WT (3)	TBD	TBD
17446	WT (31)	WT (50)	WT (40)	WT (29)	WT (8)	WT (23)	TBD	TBD
17458	WT (192)	WT (32)	WT (40)	WT (41)	WT (32)	WT (3)	TBD	TBD
17464	WT (221)	WT (33)	WT (5)	WT (5)	WT (5)	WT (76)	TBD	TBD
17467	WT (115)	WT (34)	WT (61)	WT (39)	WT (10)	WT (10)	TBD	TBD
17470	WT (79)	WT (54)	WT (134)	WT (20)	WT (107)	WT (5)	TBD	TBD
17473	WT (68)	WT (112)	WT (48)	WT (13)	WT (31)	WT (5)	TBD	TBD

【図 3】

FIGURE 3. NSCLC患者腫瘍試料の拡張された変異分析の結果

ATB 番号	EGFR Exon18	EGFR Exon19	EGFR Exon20	EGFR Exon21	EGFR Exon23	b-raf Exon11	b-raf Exon15
17096	WT (36)	WT (75)	WT (41)	WT (43)	WT (49)	WT (54)	WT (84)
17099	WT (52)	WT (107)	WT (39)	L858R (81のうち13)	WT (59)	WT (43)	WT (49)
17102	WT (73)	15bp 缺失 (63のうち43)	WT (85)	WT (26)	WT (17)	WT (21)	WT (77)
17105	WT (50)	WT (22)	WT (89)	WT (18)	WT (37)	WT (48)	WT (10)
17108	WT (84)	WT (9)	WT (80)	WT (42)	WT (43)	WT (30)	WT (116)
17111	WT (30)	WT (51)	WT (7)	WT (20)	WT (54)	WT (49)	WT (138)
17114	WT (35)	WT (90)	WT (54)	WT (36)	WT (27)	WT (66)	WT (26)
17117	WT (20)	WT (2)	WT (24)	WT (47)	WT (34)	WT (79)	WT (53)
17120	WT (80)	WT (130)	WT (13)	産物なし	WT (56)	WT (47)	WT (44)
17123	WT (87)	WT (33)	産物なし	産物なし	WT (21)	産物なし	WT (32)
17126	WT (29)	WT (31)	WT (69)	WT (28)	WT (25)	WT (57)	WT (30)
17129	L888P (145のうち15)	WT (40)	WT (95のうち9)	WT (64)	WT (25)	WT (38)	WT (55)
17132	WT (24)	WT (23)	WT (91)	WT (12)	WT (74)	WT (47)	WT (62)
17135	WT (87)	産物なし	産物なし	WT (4)	WT (90)	WT (9)	WT (58)
17138	WT (23)	産物なし	WT (33)	WT (35)	WT (24)	WT (7)	WT (46)
17141	L888P (148のうち11)	産物なし	WT (17)	WT (18)	WT (26)	WT (20)	WT (116)
17144	WT (93)	WT (22)	WT (63)	WT (49)	WT (6)	産物なし	WT (16)
17147	WT (19)	WT (6)	WT (29)	WT (49)	WT (31)	WT (65)	WT (163)
17150	WT (29)	N.D.	N.D.	WT (22)	WT (9)	WT (74)	WT (102)
17153	WT (21)	WT (81)	WT (90)	WT (25)	WT (52)	WT (23)	WT (10)
17156	WT (92)	産物なし	産物なし	産物なし	WT (3)	産物なし	WT (8)
17165	WT (89)	N.D.	WT (100)	WT (69)	WT (30)	WT (14)	WT (7)
17171	WT (24)	WT (8)	WT (40)	WT (36)	N.D.	WT (71)	WT (89)
17174	L888P (69のうち12)	産物なし	WT (5)	N.D.	WT (21)	WT (92)	WT (12)
17186	WT (67)	WT (20)	産物なし	WT (13)	WT (10)	WT (54)	WT (66)
17192	WT (19)	N.D.	WT (90)	WT (5)	WT (3)	WT (116)	WT (5)
17207	WT (13)	WT (20)	WT (33)	WT (30)	WT (19)	WT (56)	WT (84)
17231	WT (92)	産物なし	WT (131)	産物なし	WT (20)	WT (9)	産物なし
17240	WT (2)	WT (6)	WT (84)	WT (6)	WT (85)	WT (184のうち19)	WT (184のうち19)
17246	WT (34)	WT (9)	WT (40)	WT (38)	WT (3)	WT (54)	WT (70)
17273	WT (8)	WT (32)	WT (44)	WT (19)	WT (39)	WT (47)	WT (44)
17285	L888P (103のうち4)	WT (27)	WT (25)	L828 Stop (185のうち8)	WT (20)	WT (28)	WT (28)
17303	WT (16)	産物なし	WT (26)	WT (28)	WT (17)	WT (75)	WT (73)
17306	WT (88)	WT (13)	WT (37)	WT (102)	WT (10)	WT (23)	産物なし
17315	WT (29)	産物なし	WT (92)	WT (95)	WT (28)	WT (31)	WT (24)
17324	WT (91)	N.D.	WT (25)	L858R (238のうち35)	WT (2)	WT (71)	N.D.
17333	産物なし	N.D.	産物なし	WT (82)	WT (17)	WT (84)	WT (4)
17339	WT (33)	WT (18)	産物なし	L828 Stop (132のうち6)	N.D.	WT (93)	WT (71)
17360	WT (62)	WT (2)	産物なし	WT (53)	WT (89)	WT (15)	WT (2)

【図 4】



【図 5 A】

FIGURE 5A

i720.txt x His

```
1 GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACA...ACCCCCACGTGTGCCGCCT 47
  |||
1 GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCT 50
  |||
48 GCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAACTCATCAGCAGCTCATGC 97
  |||
51 GCTGGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAACTCATCAGCAGCTCATGC 100
  |||
98 CCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGC 147
  |||
101 CCTTCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGC 150
  |||
148 TCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG 186 配列番号 52
  |||
151 TCCAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG 189 配列番号 59
  |||
```

i720.pep x His.pep

```
1 EAYVMASVDN.PHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIG 49
  |||
1 EAYVMASVDNHPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIG 50
  |||
50 SQYLLNWCQIAK 62 配列番号 62
  |||
51 SQYLLNWCQIAK 63 配列番号 21
  |||
```

【図 5 B】

FIGURE 5B

i720.txt x T790M.txt

```
1 GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCT 50
  |||
1 GAAGCCTACGTGATGGCCAGCGTGGACAACCCCCACGTGTGCCGCCTGCT 50
  |||
51 GGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAACTCATCAGCAGCTCATGCCCT 100
  |||
51 GGGCATCTGCCTCACCTCCACCGTGCAACTCATCAGCAGCTCATGCCCT 100
  |||
101 TCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCC 150
  |||
101 TCGGCTGCCTCCTGGACTATGTCCGGGAACACAAAGACAATATTGGCTCC 150
  |||
151 CAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG 186 配列番号 63
  |||
151 CAGTACCTGCTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAG 186 配列番号 64
  |||
```

i720.pep x T790M.pep

```
1 EAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGS 50
  |||
1 EAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGS 50
  |||
51 QYLLNWCQIAK 62 配列番号 65
  |||
51 QYLLNWCQIAK 62 配列番号 66
  |||
```

【図 5 C】

FIGURE 5C

i7218.txt x Q701H.txt

```
1 CTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTT 50
  |||
1 CTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTT 50
  |||
51 GAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTCTGGGCTCCG 100
  |||
51 GAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTCTGGGCTCCG 100
  |||
101 GTGCGTTCGGCACGGTGTATAAG 123 配列番号 67
  |||
101 GTGCGTTCGGCACGGTGTATAAG 123 配列番号 68
  |||
```

i7218.pep x Q701H.pep

```
1 LVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTIVYK 41 配列番号 69
  |||
1 LVEPLTPSGEAPNHALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTIVYK 41 配列番号 70
  |||
```

【図 5 D】

FIGURE 5D

i7218.txt x L688P.txt

```
1 CTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTT 50
  |||
1 CTTGTGGAGCCTCTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTT 50
  |||
51 GAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTCTGGGCTCCG 100
  |||
51 GAGGATCTTGAAGGAAACTGAATTCAAAAAGATCAAAGTCTGGGCTCCG 100
  |||
101 GTGCGTTCGGCACGGTGTATAAG 123 配列番号 71
  |||
101 GTGCGTTCGGCACGGTGTATAAG 123 配列番号 72
  |||
```

i7218.pep x L688P.pep

```
1 LVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTIVYK 41 配列番号 73
  |||
1 PVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTIVYK 41 配列番号 74
  |||
```

[illegible]

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2006/006751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/71 G01N33/574 C12Q1/68		
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) C07K G01N 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 practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 91/03489 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY; DUKE UNIVERSITY) 21 March 1991 (1991-03-21) the whole document	
A	WO 01/68711 A (THOMAS JEFFERSON UNIVERSITY) 20 September 2001 (2001-09-20) the whole document	
	----- -/-- -----	
☒ 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 document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
23 June 2006		27.11.2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smalt, Rolf

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/006751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUANG S-F ET AL: "High frequency of epidermal growth factor receptor mutations with complex patterns in non-small cell lung cancers related to gefitinib responsiveness in Taiwan" CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 10, no. 24, 15 December 2004 (2004-12-15), pages 8195-8203, XP002369911 ISSN: 1078-0432 the whole document -----	
A	PAO W ET AL: "EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from never smokers and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, DC, US, vol. 101, no. 36, 7 September 2004 (2004-09-07), pages 13306-13311, XP002334314 ISSN: 0027-8424 the whole document -----	
A	GAZDAR A F ET AL: "Mutations and addiction to EGFR: the Achilles 'heel' of lung cancers?" TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, ELSEVIER CURRENT TRENDS, vol. 10, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 481-486, XP004586557 ISSN: 1471-4914 the whole document -----	
A	MARCHETTI A ET AL: "EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, GRUNE AND STRATTON, NEW YORK, NY, US, vol. 23, no. 4, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 857-865, XP002369910 ISSN: 0732-183X the whole document -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2006/006751

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/006751

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: -
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 43-50 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Invention 1: claims 1-4, 13-50, 57-60, all partially

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2006/ 006751

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-4,13-50,57-60, all partially

EGF-R polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ.ID.2, nucleic acid encoding it, vector, transformed host, method for preparing the protein, fusion proteins thereof, antibodies directed thereto and methods for obtaining them, transgenic non-human animal, nucleic acid array comprising the encoding sequence, nucleic acid probe, use in diagnosis and/or prognosis, method for identifying activity modulators, use in manufacture of a pharmaceutical composition, and kit for detecting the encoding nucleic acid.

Inventions 2-10: Claims 1-50,54-60, all partially and as far as applicable

Subject-matter essentially as defined above for invention 1, but limited to the respective EGF-R polypeptides with the respective SEQ.ID.'s 3,5,6,7,8,9,10,12 and 13.

Inventions 11-15: claims 5-24,26-30, all partially and as far as applicable.

Polypeptide comprising the amino acid sequence of the respective SEQ.ID.'s 15,16,17,19 and 20, nucleic acids encoding them, vectors, transformed hosts, method for preparing the proteins, fusion proteins thereof, antibodies directed thereto, transgenic non-human animals, and nucleic acid arrays comprising the encoding sequences.

Invention 16: claims 51-53

Method for establishing a mutant EGF-R population profile.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/006751

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9103489	A	21-03-1991	AT 135373 T	15-03-1996
			AU 639726 B2	05-08-1993
			AU 6542790 A	08-04-1991
			CA 2066428 C	28-11-2000
			DE 69025946 D1	18-04-1996
			DE 69025946 T2	17-10-1996
			EP 0491007 A1	24-06-1992
			JP 2975679 B2	10-11-1999
			JP 5500158 T	21-01-1993
WO 0168711	A	20-09-2001	CA 2408175 A1	20-09-2001
			EP 1276771 A1	22-01-2003

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C 0 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C 0 8 6
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 H 0 4 5
A 0 1 K 67/02 (2006.01)	A 0 1 K 67/02	
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00 A	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 F	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 37/00 1 0 2	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 A	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 31/5377 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/5377	
	A 6 1 K 39/395 N	

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

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 フリーマン, ダニエル

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 2、サウザンド・オークス、ピスタウツド・サークル・2 4 7 9・ナンバー・2 2

(72)発明者 ジュアン, トッド

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 2 0、ニューベリー・パーク、コール・サン・ジュアン・4 6 2 9

(72)発明者 ラデインスキー, ロバート

アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 1 3 6 2、サウザンド・オークス、ラング・ランチ・パーク・ウェイ・3 5 7 4

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA19 BA63 CA04 CA05 DA02 HA11 HA17

4B029 AA07 FA12

4B063 QA01 QA08 QA13 QA19 QQ12 QQ42 QR32 QR55 QR62 QS25

QS34

4B064 AG20 CA19 CC24 DA01

4B065 AA91X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA13 AA17 NA14 ZB26 ZB27

4C085 AA14 EE01 GG01

4C086 AA01 AA03 BC73 EA17 EA18 GA07 GA09 MA01 MA04 NA14
ZB26 ZB27

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA41 DA50 DA76 EA28 EA51
FA74