

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6858563号
(P6858563)

(45) 発行日 令和3年4月14日 (2021.4.14)

(24) 登録日 令和3年3月26日 (2021.3.26)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 Q 1/6827 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6827 Z

C 1 2 N 15/11 (2006.01)

C 1 2 N 15/11 Z N A Z

C O 7 K 14/82 (2006.01)

C O 7 K 14/82

請求項の数 16 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2016-566575 (P2016-566575)	(73) 特許権者	510097747
(86) (22) 出願日	平成27年12月25日 (2015.12.25)		国立研究開発法人国立がん研究センター
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/086420		東京都中央区築地五丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02016/104794	(73) 特許権者	590002389
(87) 国際公開日	平成28年6月30日 (2016.6.30)		静岡県
審査請求日	平成30年11月28日 (2018.11.28)		静岡県静岡市葵区追手町9番6号
(31) 優先権主張番号	特願2014-266577 (P2014-266577)	(73) 特許権者	399077674
(32) 優先日	平成26年12月26日 (2014.12.26)		G & Gサイエンス株式会社
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)		福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1
前置審査		(74) 代理人	100080791
			弁理士 高島 一
		(74) 代理人	100136629
			弁理士 鎌田 光宣
		(74) 代理人	100125081
			弁理士 小合 宗一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BRAF変異検出によるEGFR阻害剤の効果予測

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者の大腸がん（直腸・結腸がん）組織サンプルを用いて、配列番号1のヒトBRAFタンパク質のアミノ酸配列において、Q524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAFの突然変異を検出するステップを含み、前記BRAFの突然変異が検出された大腸がん（直腸・結腸がん）はEGFR阻害剤による治療に適さない、ここで前記EGFR阻害剤はセツキシマブ又はパニツムマブである、EGFR阻害剤の治療効果を予測する方法。

【請求項2】

前記EGFR阻害剤は、イリノテカンか、FOLFOXか、FOLFIRIか、FOLFIRIか、FOLFIRI及びベバシズマブかとともに併用される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の大腸がん（直腸・結腸がん）組織サンプルから抽出した核酸の塩基配列のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定することを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の大腸がん（直腸・結腸がん）組織サンプルから抽出した核酸の塩基配列のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも

10

20

も1つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドを特異的に増幅することを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項5】

(a) 患者の大腸がん（直腸・結腸がん）組織サンプルからDNAを単離するステップと、

(b) 配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基をコードする塩基配列を挟むプライマーの対と、前記単離されたDNAとをハイブリダイズさせるステップと、

(c) 前記単離したDNAとプライマーの対とを用いて、配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基をコードする塩基配列を有するBRAF遺伝子DNAを増幅させるステップと、

(d) 前記増幅されたBRAF遺伝子DNAをプローブと接触させるステップと、

(e) 前記増幅されたBRAF遺伝子DNAとハイブリダイズしたプローブを検出するステップとを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項6】

セツキシマブ又はパニツムマブの治療効果を予測するためのキットであって、

配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を含む塩基配列を特異的に検出するためのプライマー又はプローブオリゴヌクレオチドを含む、

前記治療効果は、前記BRAFの突然変異が検出された大腸がん（直腸・結腸がん）はセツキシマブ又はパニツムマブによる治療に適さないことである、キット。

【請求項7】

前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列において、Q524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定することにより、配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出する、請求項6に記載のキット。

【請求項8】

前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列において、Q524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む、塩基配列を有するRNA及び／又はDNAを鋳型とするポリヌクレオチドを特異的に増幅することにより、配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出する、請求項6に記載のキット。

【請求項9】

前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号23～30からなる群から選択される少なくとも1本の配列からなる、請求項6ないし8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】

前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号23～26のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号27～30のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対である、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列において、Q524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む、塩基配列を有するRNA及び／又はDNAと雑種形成することにより、配列番号2の塩基配列においてQ524L又はL525Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出する、請求項6に記載のキット。

【請求項12】

前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号61～82からなる群から選択される少なくとも1本の配列のプローブオリゴヌクレオチドである、請求項11に記載のキット。

【請求項13】

前記プライマー又はプローブオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列のうち、Q

10

20

30

40

50

5 2 4 L又はL 5 2 5 Rのアミノ酸残基の置換を起こすヒトB R A F遺伝子の突然変異塩基を含む塩基配列か、その相補配列かを含む、請求項6ないし8及び11のいずれか1項に記載のキット。

【請求項14】

前記プライマーオリゴヌクレオチドは、その5'末端と3'末端との間にリボヌクレアーゼ酵素認識部位を含み、

該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は、RNAの連続配列であって、前記アミノ酸残基の置換を起こす突然変異塩基を含み、該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は相補的な塩基配列を有するDNAと対合してヘテロ2本鎖を形成するとき、耐熱性RNAse Hにより特異的に切断される、請求項6ないし13のいずれかに記載のキット。

10

【請求項15】

前記プライマー又はプローブオリゴヌクレオチドは少なくとも前記アミノ酸残基の置換を起こす突然変異塩基に核酸アナログを含む、請求項6ないし14のいずれか1項に記載のキット。

【請求項16】

ヒトB R A Fタンパク質を発現する宿主細胞にB R A Fが介在するシグナル伝達系阻害剤を曝露するステップと、前記宿主細胞の細胞増殖促進シグナル伝達に与える前記阻害剤の効果を調べるステップとを含み、前記ヒトB R A Fタンパク質は、配列番号1のヒトB R A Fタンパク質のアミノ酸配列において、Q 5 2 4 L又はL 5 2 5 Rのアミノ酸残基の置換を起こす単離ヒトB R A Fの体細胞突然変異タンパク質であり、前記阻害剤の非存在下と比較して前記阻害剤の存在下で前記宿主細胞の細胞増殖促進シグナル伝達が抑制されるとき、前記ヒトB R A Fタンパク質に含まれるアミノ酸残基置換体細胞突然変異が検出された大腸がん（直腸・結腸がん）に対して前記阻害剤は治療効果があり、あるいは、前記阻害剤の非存在下と比較して前記阻害剤の存在下で前記宿主細胞の細胞増殖促進シグナル伝達が抑制されないとき、前記ヒトB R A Fタンパク質に含まれるアミノ酸残基置換体細胞突然変異が検出された大腸がん（直腸・結腸がん）に対して前記阻害剤は治療効果がない、B R A Fが介在するシグナル伝達系阻害剤のヒトB R A F体細胞突然変異が検出された大腸がん（直腸・結腸がん）に対する治療効果を予測する方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、がん治療薬の薬効を予測する方法に関する。具体的には本発明は、抗EGFR抗体薬に適さないB R A F突然変異の新規な抗EGFR抗体薬治療効果予測マーカーを検出する方法と、その検査キットとに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、転移性大腸がん（metastatic colorectal cancer）の治療成績が向上し、フルオロウラシル単独投与では12ヶ月であった平均余命が約2年にまで延びるまでになった（非特許文献1）。この延命効果は、フルオロウラシルに加えて、EGF（上皮成長因子）受容体（EGFR）に特異的なモノクローナル抗体製剤（以下、「抗EGFR抗体薬」という。）をイリノテカン（irinotecan）、オキサリプラチン（oxaliplatin、L-OHP）等とともに併用することにより得られた。前記抗EGFR抗体薬には、セツキシマブ（Cetuximab）、パニツムマブ（Panitumumab）等が知られている。このうちセツキシマブは、ヒトEGFRに対するマウスモノクローナル抗体225を遺伝子工学的にヒト抗体遺伝子に部分置換して得られたキメラ抗体である。パニツムマブは、ヒト抗体遺伝子座の染色体DNAを導入したトランスジェニックマウスを用いて作成されたモノクローナル抗体である。イリノテカンとはトポイソメラーゼI阻害活性によりDNA複製を阻害する。オキサリプラチンは白金製剤でDNAと結合してがん細胞のDNA複製及び転写を阻害する。前記抗EGFR抗体薬は、フルオロウラシル、イリノテカン、オキサリプラチン等の合成化合物製剤と併用される他、さらに、ベバシズマブ（Bevacizumab）のような血管内皮細胞増殖

40

50

因子（VEGF）に対する抗体製剤と併用される場合がある。前記血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に対する抗体製剤は、VEGFの働きを阻害するもので、VEGFを発現しないがん細胞であっても、血管新生を抑制してがん組織への血液供給を低減することでがんの増殖を阻害することができる。

【0003】

抗EGFR抗体薬は、EGFがEGFRに結合するのを阻害することにより、EGFRから下流へのシグナル伝達を阻害して、がん細胞の増殖を抑制しがん組織を縮小する。しかし、がん細胞のKRAS、BRAF等の遺伝子に体細胞突然変異が存在するときには、抗EGFR抗体薬は薬効を示さないことが知られている（特許文献1及び2、非特許文献2）。このうちKRASについては、KRASタンパク質の12位、13位、59位、61位、117位又は146位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異がKRASタンパク質の機能を構成的に活性化させる。KRASタンパク質はEGFRへのEGF結合に始まる細胞増殖促進シグナルの伝達経路に属する。そのため、抗EGFR抗体によるEGFRからのシグナル伝達阻害が突然変異体KRASにより無効にされ、前記シグナル伝達経路の下流に細胞増殖促進シグナルが伝達される。これがKRAS突然変異体による抗EGFR抗体薬の薬効阻害の機序である。大腸がん細胞ではKRASと同じ遺伝子ファミリーに属するNRASも発現する。そのため、KRASは野生型でも、NRASの12位、13位、59位、61位、117位又は146位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異の場合には、抗EGFR抗体薬の薬効が阻害される。そこで本明細書では、KRAS及びNRASのいずれにも体細胞突然変異が検出されない腫瘍をRAS野生型といい、12位、13位、59位、61位、117位又は146位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異がKRAS又はNRASの少なくともいずれか1つに検出される腫瘍をRAS変異型という。

【0004】

抗EGFR抗体薬セツキシマブ（アービタックス（登録商標））の日本で販売される際の添付文書には、効能・効果に関連する使用上の注意として、「EGFR陽性の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がんに対する本剤の使用に際してはKRAS遺伝子変異の有無を考慮した上で、適応患者の選択を行うこと」と記載されている。また、抗EGFR抗体薬パニツムマブ（ペクティビックス（登録商標））の日本で販売される際の添付文書には、効能・効果として、「KRAS遺伝子野生型の治癒切除不能な進行・再発の結腸・直腸がん」と記載され、効能・効果に関連する使用上の注意として、「KRAS遺伝子変異を示す患者での有効性は確立していない。」と記載されている。欧州では、セツキシマブ及びパニツムマブはRASが野生型の大腸がんに適用されるように制限されている。

【0005】

RASタンパク質の12位又は13位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異とBRAFの体細胞突然変異とが共存する大腸がんの症例は非常に少ないことが知られている。そこで大腸がんでは、RAS及びBRAFがEGFRへのEGF結合に始まる細胞増殖促進シグナルの同一の伝達経路に属しており、RASが野生型であっても、BRAFに機能を構成的に活性化させる体細胞突然変異があれば、抗EGFR抗体薬の薬効が阻害される可能性がある。

【0006】

BRAFの機能を構成的に活性化させる体細胞突然変異としては、BRAFタンパク質の600位のバリンがグルタミン酸に置換される突然変異（以下、「V600E」という。）が最もよく知られている。しかし、KRAS又はNRASタンパク質の12位、13位、59位、61位、117位、又は146位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異が抗EGFR抗体薬の効果予測マーカーであることが繰り返し確認されているのとは異なり、BRAFのV600E突然変異については、大規模な治験（CRYSTAL試験及びOPUS試験）のデータの解析によって、BRAFのV600E突然変異は予後が悪いことを予測するマーカーであることは確認されたが、抗EGFR抗体薬の治療効果予測マーカーであることは確認されなかった。しかし、BRAF変異型症例数が少なすぎるため、

この結果により予後マーカーや効果予測マーカーとしての可能性を解析するには至らないと結論している（非特許文献3）。

【0007】

最近のがん組織の飽和的解析の報告（非特許文献3）から、BRAFはKRASとは異なり、大腸がんではV600E突然変異以外の突然変異の頻度が比較的高く、V600E突然変異が優占的とはいえないことが明らかになっている。BRAFの突然変異のうちD594突然変異は、V600E突然変異に比べると頻度が大幅に低いものの、大腸がんではしばしば見いだされることが知られた突然変異である。594位のアスパラギン酸残基はDFGモチーフに含まれ、アスパラギン酸残基のカルボキシル基の酸素原子は、触媒部位での Mg^{2+} イオンのキレート化及びATP結合の安定化に関与することが知られている。D594突然変異体のうち、D594A又はD594V変異型BRAFは、自らのキナーゼ活性を失っているにもかかわらず、前記変異型RASの存在下でのみ野生型CRAFと結合して、CRAFのキナーゼ活性を亢進させるとの報告がある（非特許文献5）。一方で、D594G変異型BRAFは、セツキシマブの薬効とは相関しないこととの報告がある（非特許文献6）。よって、D594突然変異が抗EGFR抗体薬等のEGFR阻害剤の効果予測マーカーになるかどうかについては置換したアミノ酸残基によって結論が異なる。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

20

【特許文献1】欧州特許公報EP1913157B1

【特許文献2】米国特許出願公開公報US2012/0264129A1

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Moorcraft, S.Y.ら、Ther. Adv. Gastroenterol., 6: 381-395 (2013)

【非特許文献2】Siena, S.ら、J. Natl. Cancer Inst., 101: 1308-1324 (2009)

【非特許文献3】Bokemeyer, C.ら、Eur. J. Cancer, 48: 1466-1475 (2012)

【非特許文献4】Lawrence, M.S.ら、Nature, 505: 495-501 (2014)

【非特許文献5】Heidorn, S. J.ら、Cell, 140: 209-221 (2010)

【非特許文献6】Smith, C. G.ら、Clin. Cancer Res, 19: 4104-4113, (2013)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

以上のとおり、V600E及びD594変異型BRAFの結果から、BRAFキナーゼ活性の構成的活性化又は失活という酵素活性だけに基づいて、BRAFの体細胞突然変異とEGFR阻害剤の治療効果との関係を予測することはできない。そこで、EGFR阻害剤抗がん剤への適応性をよりの確に判定するためには、V600E突然変異以外の全てのBRAF突然変異を考慮した解析を行って、EGFR阻害剤に適さないBRAF突然変異の新規な抗EGFR抗体薬治療効果予測マーカーを検出する技術を開発する必要がある。

【課題を解決するための手段】

40

【0011】

今回、網羅的遺伝子解析技術を用いた抗EGFRモノクローナル抗体薬治療効果予測バイオマーカーの探索研究に関する多施設共同研究（Biomarker Research for Anti-EGFR Monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer Genomics、以下、「BREA C試験」という。）では、大腸がんのBRAF体細胞突然変異の半数近くがV600E以外の突然変異体であった。そこで本件発明者らは、抗EGFR抗体薬をはじめとするEGFR阻害剤の単独治療か、又はBRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤以外の化学療法剤との併用治療かの治療効果を予測するための、BRAF突然変異の新規な効果予測マーカーを検出する技術を開発した。

【0012】

50

本発明は、抗EGFR抗体薬の治療効果を予測するヒトBRAFの突然変異を検出する方法を提供する。本発明のヒトBRAFの体細胞突然変異を検出する方法は、患者生体サンプルを用いて、配列番号1のヒトBRAFタンパク質のアミノ酸配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAFの突然変異を検出するステップを含み、前記遺伝子の突然変異が検出された腫瘍は、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤による治療に適さない。

【0013】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAFの突然変異を検出するステップの場合がある。

10

【0014】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤は、EGFR阻害剤の場合がある。

【0015】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤は、抗EGFR抗体薬の場合がある。

【0016】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤は、該阻害剤以外の化学療法剤、例えば、イリノテカン、FOLFFOX、又はFOLFIRIとともに併用される場合がある。

20

【0017】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記患者の生体サンプルは、腫瘍組織サンプル、体液サンプル、分泌物サンプル及び排泄物サンプルからなる群から選択される少なくとも1つのサンプルの場合がある。

【0018】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の生体サンプルから抽出した核酸の塩基配列のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定することを含む場合がある。

30

【0019】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の生体サンプルから抽出した核酸のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドを特異的に増幅することを含む場合がある。

【0020】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法は、(a)患者の生体サンプルからDNAを単離するステップと、(b)配列番号2の塩基配列においてG469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基をコードする塩基配列を挟むプライマーの対と、前記単離されたDNAとをハイブリダイズさせるステップと、(c)前記単離したDNAとプライマーを用いて、配列番号2の塩基配列においてG469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基をコードする塩基配列を有するBRAF遺伝子DNAを増幅させるステップと、(d)前記増幅されたBRAF遺伝子DNAを固相に固定された若しくは液相中でプローブと接触させるステップと、(e)前記増幅されたBRAF遺伝子DNAとハイブリダイズした前記固相に固定された若しくは液相中のプローブを検出するステップとを含む場合がある。

40

【0021】

本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法において、前記ヒトBRAFの突然変

50

異を検出するステップは、患者の生体サンプルから、ヒト B R A F タンパク質の前記少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を含むペプチドを検出することを含む場合がある。

【0022】

本発明のヒト B R A F の突然変異を検出する方法において、前記腫瘍は大腸がんの場合がある。

【0023】

本発明は、E G F R 阻害剤の治療効果を予測するヒト B R A F の突然変異を検出するためのキットを提供する。本発明のキットは、配列番号 2 の塩基配列において G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を起こすヒト B R A F 遺伝子の突然変異を含む、塩基配列を特異的に検出するためのプライマー又はプローブオリゴヌクレオチドを含む。

10

【0024】

本発明のキットは、B R A F 遺伝子における G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 を含む DNA を増幅するように設計されたフォワードプライマー、及びリバースプライマーを含み、B R A F 遺伝子の突然変異を検出する場合がある。

【0025】

本発明のキットにおいて、前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の塩基配列において G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定することにより、配列番号 2 の塩基配列において G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を起こすヒト B R A F 遺伝子の突然変異を検出する場合がある。

20

【0026】

本発明のキットにおいて、前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 2 の塩基配列において G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を起こすヒト B R A F 遺伝子の突然変異塩基を含む、塩基配列を有する RNA 及び／又は DNA を鋳型とするポリヌクレオチドを特異的に増幅することにより、配列番号 2 の塩基配列において G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 からなる群から選択される少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を起こすヒト B R A F 遺伝子の突然変異を検出する場合がある。

30

【0027】

本発明のキットにおいて、前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 3～40 からなる群から選択される少なくとも 1 本の配列からなる場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 3～40 からなる群から選択される少なくとも 1 本の配列を含む場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、10 ないし 50 個のヌクレオチド、代替的には、15 ないし 40 個、あるいは、18 ないし 30 個のヌクレオチドからなる場合がある。

【0028】

本発明のキットにおいて、前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 3～9 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号 10～14 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号 15～18 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号 19～22 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号 23～26 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号 27～30 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号 31～35 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号 36～40 のいずれか 1 本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対とからなるプライマーオリゴヌクレオチドの対の少なくとも 1 対の場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号 3～40 からなる群から選択される少なくとも 1 本の配列を含む場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、10 ないし 50 個のヌクレオチド、代替的には、15 ない

40

50

し40個、あるいは、18ないし30個のヌクレオチドからなる場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～9のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号10～14のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号15～18のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号19～22のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号23～26のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号27～30のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号31～35のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号36～40のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対とからなるプライマーオリゴヌクレオチドの対の少なくとも1対の場合がある。

10

【0029】

本発明のキットにおいて、前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む、塩基配列を有するRNA及び／又はDNAと雑種形成することにより、配列番号2の塩基配列においてG469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出する場合がある。該プローブオリゴヌクレオチドは、固相に不動化される場合がある。

20

【0030】

本発明のキットにおいて、前記プライマー又はプローブオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列のうち、G469A、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む塩基配列か、その相補配列かを含む場合がある。

【0031】

本発明のキットにおいて、前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号41～98からなる群から選択される少なくとも1本の配列の場合がある。前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号41～98からなる群から選択される少なくとも1本の配列を含む場合がある。前記プローブオリゴヌクレオチドは、10ないし50個のヌクレオチド、代替的には、15ないし40個、あるいは、18ないし30個のヌクレオチドからなる場合がある。

30

【0032】

本発明のキットにおいて、前記ヒトBRAF遺伝子の突然変異は、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異の場合がある。

【0033】

本発明のキットにおいて、前記プライマーオリゴヌクレオチドは、その5'末端と3'末端との間にリボヌクレアーゼ酵素認識部位を含み、該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は、RNAの連続配列であって、前記アミノ酸残基の置換を起こす突然変異塩基を含み、該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は相補的な塩基配列を有するDNAと対合してヘテロ2本鎖を形成するとき、耐熱性RNaseHにより特異的に切断される場合がある。

40

【0034】

本発明のキットにおいて、前記プライマー又はプローブオリゴヌクレオチドは少なくとも前記アミノ酸残基の置換を起こす突然変異塩基に核酸アナログを含む場合がある。核酸アナログには、2', 4'-BNA (Bicyclic nucleoside)、PNA (Peptide Nucleic Acid)、ENA (Ethylene nucleoside acid) 又はLNA (Locked nucleoside acid) を含む場合があるがこれらに限定されない。

【0035】

本発明のキットは、前記プライマー又はプローブオリゴヌクレオチドに加えて、dNT

50

Pなどの酵素反応基質と、DNAポリメラーゼ、リボヌクレアーゼなどの酵素と、酵素反応液、ハイブリダイゼーション緩衝液、洗浄用緩衝液などの溶液又は該溶液調製用固体組成物と、ニトロセルロース膜、ナイロン膜などの核酸不動化用固相と、能書とからなるグループから選択される少なくとも1つを含む場合がある。

【0036】

本発明は、配列番号1のヒトBRRAFタンパク質のアミノ酸配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含む単離ヒトBRRAFの体細胞突然変異タンパク質、又は、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含むヒトBRRAF体細胞突然変異タンパク質の単離ペプチド断片を提供する。

10

【0037】

本発明は、本発明の単離ヒトBRRAFの体細胞突然変異タンパク質又はヒトBRRAF体細胞突然変異タンパク質の単離ペプチド断片に結合するが、野生型ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチドとは結合しない抗体又は抗体断片を提供する。

【0038】

本発明は、本発明の単離ヒトBRRAFの体細胞突然変異タンパク質又はヒトBRRAF体細胞突然変異タンパク質の単離ペプチド断片を発現する宿主細胞を提供する。本発明の宿主細胞は、発明の単離ヒトBRRAFの体細胞突然変異タンパク質又はヒトBRRAF体細胞突然変異タンパク質の単離ペプチド断片をコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含み、該発現ベクターは前記宿主細胞内での遺伝子の発現を可能にする制御領域を含み、該制御領域は前記ポリヌクレオチドと動作可能に連結される。

20

【0039】

本発明は、BRRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤のヒトBRRAF体細胞突然変異に対する治療効果を予測する方法を提供する。本発明の治療効果を予測する方法は、本発明の宿主細胞にBRRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤を曝露するステップと、前記宿主細胞の増殖に与える前記阻害剤の効果を調べるステップとを含み、前記阻害剤の非存在下と比較して前記阻害剤の存在下で前記宿主細胞の増殖が抑制されるとき、前記ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片に含まれるアミノ酸残基置換体細胞突然変異に対して前記阻害剤は治療効果があり、あるいは、前記阻害剤の非存在下と比較して前記阻害剤の存在下で前記宿主細胞の増殖が抑制されないとき、前記ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片に含まれるアミノ酸残基置換体細胞突然変異に対して前記阻害剤は治療効果がないと予測する。

30

【0040】

本発明は、単離ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片の発現方法を提供する。本発明の単離ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片の発現方法は、本発明の単離ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片をコード化するポリヌクレオチドを含む発現ベクターを宿主細胞に導入するステップと、該宿主細胞中で前記単離ヒトBRRAFタンパク質又はその単離ペプチド断片を発現するステップとを含み、前記宿主細胞内での遺伝子の発現を可能にする制御領域が前記発現ベクターに含まれ、該制御領域は前記ポリヌクレオチドと動作可能に連結される。

40

【0041】

本発明は、BRRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤の治療効果を予測するヒトBRRAFの突然変異タンパク質を検出するための参照タンパク質組成物を提供する。本発明の参照タンパク質組成物は、配列番号1のヒトBRRAFタンパク質のアミノ酸配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含む単離ヒトBRRAFタンパク質か、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含むヒトBRRAFタンパク質の単離ペプチド断片を含む。

50

【0042】

本発明は、配列番号2の塩基配列のうち、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む変異型ヒトBRAF cDNA塩基配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0043】

本発明は、配列番号2の塩基配列のうち、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つの変異を検出するためのプローブオリゴヌクレオチドを提供する。前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号41～98からなる群から選択される少なくとも1本の配列を含む場合がある。前記プローブオリゴヌクレオチドは、配列番号41～98からなる群から選択される少なくとも1本の配列の場合がある。前記プローブオリゴヌクレオチドは、10ないし50個のヌクレオチド、代替的には、15ないし40個、あるいは、18ないし30個のヌクレオチドからなる場合がある。

10

【0044】

本発明は、配列番号2の塩基配列のうち、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つの変異を検出するためのプライマーオリゴヌクレオチドを提供する。該プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号2の塩基配列においてG469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基を含む、塩基配列を有するRNA及び／又はDNAを鋳型とするポリヌクレオチドを特異的に増幅することにより、配列番号2の塩基配列においてG469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出する場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～40からなる群から選択される少なくとも1本の配列からなる場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～40からなる群から選択される少なくとも1本の配列を含む場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、10ないし50個のヌクレオチド、代替的には、15ないし40個、あるいは、18ないし30個のヌクレオチドからなる場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～9のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号10～14のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号15～18のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号19～22のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号23～26のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号27～30のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号31～35のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号36～40のいずれか1本の配列からなるプライマーオリゴヌクレオチドの対とからなるプライマーオリゴヌクレオチドの対の少なくとも1対の場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～40からなる群から選択される少なくとも1本の配列を含む場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、10ないし50個のヌクレオチド、代替的には、15ないし40個、あるいは、18ないし30個のヌクレオチドからなる場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、配列番号3～9のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号10～14のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号15～18のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号19～22のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号23～26のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号27～30のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対と、配列番号31～35のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドと配列番号36～40のいずれか1本の配列を含むプライマーオリゴヌクレオチドの対とからなるプライマーオリ

20

30

40

50

ゴヌクレオチドの対の少なくとも1対の場合がある。前記プライマーオリゴヌクレオチドは、その5'末端と3'末端との間にリボヌクレアーゼ酵素認識部位を含み、該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は、RNAの連続配列であって、前記アミノ酸残基の置換を起こす突然変異塩基を含み、該リボヌクレアーゼ酵素認識部位は相補的な塩基配列を有するDNAと対合してヘテロ2本鎖を形成するとき、耐熱性RNAseHにより特異的に切断される場合がある。

【0045】

本発明は腫瘍の治療方法を提供する。本発明の腫瘍の治療方法は、患者の生体サンプルを用いて、配列番号1のヒトBRAFタンパク質のアミノ酸配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAFの突然変異を検出するステップと、前記ヒトBRAFの突然変異が検出された患者には、BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤を含む処方投与するステップとを含む。該BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤は、BRAF阻害剤、MEK阻害剤及びPI3K阻害剤のうち少なくとも1種類の場合がある。前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤は、BRAF阻害剤を少なくとも含む場合がある。前記処方は、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤単剤治療か、前記BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤と、フルオロウラシル、イリノテカン、フォリン酸、オキサリプラチン、カペシタビン、ロイコボリン、テガフル・ウラシル、ギメラシル、オテラシルカリウム及びトリフルリジン・チピラシル(TAS-102)からなる群から選択される少なくとも1つの化学療法剤との組みあわせの場合がある。前記処方は、さらに、VEGF阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ベバシズマブ、アフリベルセプト、ラムシルマブ、PD-1、PD-L1、CTLA-4の活性を阻害する抗体、遺伝子組み換えタンパク質又は低分子薬との組みあわせの場合がある。前記処方は、さらに、EGFR阻害剤を含む場合がある。本発明の腫瘍の治療方法において、ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rからなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異を検出するステップの場合がある。

【0046】

本発明の腫瘍の治療方法において、前記患者の生体サンプルを用いて、配列番号1のヒトBRAFタンパク質のアミノ酸配列において、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、本発明のヒトBRAFの突然変異を検出する方法により実施される。前記患者の生体サンプルは、腫瘍組織サンプル、血液サンプル、分泌物サンプル、排泄物サンプルの場合がある。本発明の腫瘍の治療方法において、前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の生体サンプルから抽出した核酸の塩基配列のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定することを含む場合がある。前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の生体サンプルから抽出した核酸の塩基配列のうち、ヒトBRAF遺伝子の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドを特異的に増幅することを含む場合がある。本発明の腫瘍の治療方法において、前記ヒトBRAFの突然変異を検出するステップは、患者の生体サンプルから、ヒトBRAFタンパク質の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含むペプチドを検出することを含む場合がある。本発明の腫瘍の治療方法において、腫瘍は大腸がんの場合がある。

【0047】

本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】無増悪生存期間（PFS）のKaplan-Meier曲線。

【図2】全生存期間（OS）のKaplan-Meier曲線。

【図3A】RAS野生型対RAS変異型（RAS W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線。

【図3B】RAS野生型かつBRAF 600位野生型対RAS野生型かつBRAF V600E変異型（RAS/BRAF V600E W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線。

【図3C】RAS野生型かつBRAF野生型対RAS野生型かつBRAF変異型（RAS/BRAF W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線。 10

【図4】空ベクター（pQCXIP）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（Q524L及びL525R）を発現するベクターとをトランスフェクションしたHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFlag抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図4の上段では、Flagタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図4の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。

【図5】図5は、空ベクター（Vector）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（Q524L及びL525R）を発現するベクターとをトランスフェクションして、異なる濃度（0、0.5及び5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）のセツキシマブを添加した培地で培養したHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFlag抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図5の上段では、Flagタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図5の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。 20

【図6】図6は、空ベクター（pQCXIP）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（Q524L、L525R、G464V、G466V、G469A、G469V、L485F、N581S、D594N、D594G、G596R及びV600R）を発現するベクターとをトランスフェクションしたHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFlag抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図6の上段では、Flagタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図6の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。 30

【図7】図7は、空ベクター（Vector）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（G466V、D594N、D594G及びG596R）を発現するベクターとをトランスフェクションして、異なる濃度（0及び5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）のセツキシマブを添加した培地で培養したHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFlag抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図7の上段では、Flagタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図7の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。 40

【発明を実施するための形態】

【0049】

本明細書に添付する配列表には、配列番号1としてヒト野生型BRAFタンパク質のアミノ酸配列、配列番号2としてヒト野生型BRAF cDNAの塩基配列を記載する。本明 50

細書において、タンパク質のアミノ酸残基は、アミノ酸の1文字表記と、タンパク質のアミノ末端からのアミノ酸残基の位置との組合せで表される。例えばV 6 0 0は、6 0 0位（アミノ末端から6 0 0番目）のアミノ酸残基がバリンであることを表す。タンパク質のアミノ酸置換突然変異は、野生型タンパク質でのアミノ酸の1文字表記と、タンパク質のアミノ末端からのアミノ酸残基の位置と、変異型タンパク質で置換されたアミノ酸の1文字表記との組合せで表される。例えばV 6 0 0 Eは、6 0 0位のアミノ酸残基が野生型ではバリンであったのが、グルタミン酸に置換された突然変異を表す。なお、ヒトB R A Fタンパク質の1次構造については、2 0 0 0年代前半に翻訳開始位置の特定に誤りが見つかって、アミノ酸残基の位置が1個分カルボキシル末端にシフトした。そのためV 6 0 0 Eは古い文献ではV 5 9 9 Eと表記されている点に注意を要する。

10

【0 0 5 0】

本願に添付する配列表に記載の配列番号と、配列の名称と、配列の内容との関係は以下に示すとおりである。

【0 0 5 1】

【表 1 - 1】

SEQ ID NO.	exon	F/R	Name	Sequence (5'→3')
1			human BRAF protein	uniprot P15056-1
2			human BRAF mRNA	ENA M95712.2
3	exon_11	Forward	BR11_F01	TCAACAAACACTTggTAGACg
4			BR11_F03	TCgAgTgATgATTgggAgATTc
5			BR11_F04	AACACTTggTAGACgggACTC
6			BR11_F05	ACTTggTAGACgggACTCgAg
7			BR11_F07	AgATTCCTgATgggCAgATTAC
8			BR11_F08	ATTCCTgATgggCAgATTACAg
9			BR11_F10	TTACTgTTTTTATCAAgAAAACACTTggTAG
10		Reverse	BR11_R01	TgTCACAATgTCACCACATTACATAC
11			BR11_R02	gTCACCACATTACATACTTACCATg
12			BR11_R03	CAATgTCACCACATTACATACTTACC
13			BR11_R04	CATgCCACTTTCCCTTgTAG
14			BR11_R05	CACATTACATACTTACCATgCCAC
15	exon_12	Forward	BR12_F01	gACACTTggAgTAACAATgCC
16			BR12_F02	AACAATgCCTTTTAggTgATg
17			BR12_F03	ATTgCCTTTTAggTgATgTggC
18			BR12_F04	ggAgTAACAATgCCTTTTAgg
19		Reverse	BR12_R01	ATTTTTgAAggCTTgTAACTgC
20			BR12_R02	gAAggCTTgTAACTgCTgAgg
21			BR12_R03	ggCTTgTAACTgCTgAggTgTAG
22			BR12_R04	ACTTCATTTTgAAggCTTgTAAC
23	exon_13	Forward	BR13_F01	TTgTACAggAAAACACgACATg
24			BR13_F02	TgTACAggAAAACACgACATgTg
25			BR13_F03	CATTTCTTTgTACAggAAAACACgA
26			BR13_F04	CTTTgTACAggAAAACACgAC
27		Reverse	BR13_R01	CCTCACACCACTgggTAAC
28			BR13_R02	TgATACAAgCTGGAgCCCTC
29			BR13_R03	gATACAAgCTGGAgCCCTCA
30			BR13_R04	TggTCTCAATgATATggAgATg
31	exon_15	Forward	BR15_F01	TTTCTTCATgAAgACCTCACAg
32			BR15_F02	gCTCTgATAggAAAATgAgATC
33			BR15_F05	CTTCATAATgCTTgCTCTgATAgg
34			BR15_F06	CATgAAgACCTCACAgTAAAAATAgg
35			BR15_F08	TCTACTgTTTTCTTTACTTACTACACCTC
36		Reverse	BR15_R01	CTTACCATCCACAAAATGGATCCAG
37			BR15_R02	ATGGATCCAGACAACGTGTTCAAAC
38			BR15_R03	CTAGTAACTCAGCAGCATCTCAG
39			BR15_R05	GCCTCAATTCTTACCATCCAC
40			BR15_R07	CCACAAAATGGATCCAGACAAC

10

20

30

40

【表 1 - 2】

SEQ ID NO.	Target	Mutation	Probe Name	Sequence (5'⇒3')
41	G469A	1406G>C	BR_G469A_01S	gATCTggATCATTgCAACA
42			BR_G469A_02S	ATCATTgCAACAgtCTACA
43			BR_G469A_03S	ggATCATTgCAACAgtCTAC
44			BR_G469A_01A	CTgTTgCAAATgATCCAgtATC
45			BR_G469A_02A	CTTgTAgACTgTTgCAAATgAT
46			BR_G469A_03A	gTAgACTgTTgCAAATgATCC
47			BR_G469A_04S	ggATCTggATCATTgCAACA
48			BR_G469A_05S	CTggATCATTgCAACAgtCTA
49			BR_G469A_08S	ggATCATTgCAACAgtCTACA
50			BR_G469A_06S	gATCATTgCAACAgtCTACA
51	L485F	1455G>T	BR_L485F_01S	TggCgAgTgAAAATgTTTAATgTg
52			BR_L485F_02S	gCgAgTgAAAATgTTTAATgTgAC
53			BR_L485F_03S	gTgAAAATgTTTAATgTgACAgC
54			BR_L485F_05S	CgAgTgAAAATgTTTAATgTgACAg
55			BR_L485F_06S	AgTgAAAATgTTTAATgTgACAgC
56			BR_L485F_09S	gAAAATgTTTAATgTgACAgCACC
57			BR_L485F_04S	gAAAATgTTTAATgTgACAgCAC
58			BR_L485F_01A	CACATTAACATTTTCACTgCCA
59			BR_L485F_03A	gCTgTCACATTAACATTTTCAC
60			BR_L485F_04A	gTgCTgTCACATTAACATTTTC
61	Q524L	1571A>T	BR_Q524L_02S	TTCCACAAgCCACTACTgg
62			BR_Q524L_08S	CACAAgCCACTACTggCTA
63			BR_Q524L_09S	ACAAgCCACTACTggCTATT
64			BR_Q524L_10S	AAAgCCACTACTggCTATTgT
65			BR_Q524L_12S	AAgCCACTACTggCTATTgTTA
66			BR_Q524L_04S	CAAAGCCACTACTggCTATTg
67			BR_Q524L_05S	gCCACTACTggCTATTgTTAC
68			BR_Q524L_02A	CCAgTAgtggCTTTgTggAA
69			BR_Q524L_03A	ATAGCCAgTAgtggCTTTgTg
70			BR_Q524L_04A	CAATAGCCAgTAgtggCTTTg
71			BR_Q524L_05A	gTAACAATAGCCAgTAgtggC

10

20

30

【 0 0 5 3 】

【表 1 - 3】

SEQ ID NO.	Target	Mutation	Probe Name	Sequence (5'⇒3')
72	L525R	1574T>G	BR_L525R_01S	CACAAAgCCACAACgggCTA
73			BR_L525R_02S	CAAAGCCACAACgggCTATTg
74			BR_L525R_07S	AAAGCCACAACgggCTATTg
75			BR_L525R_08S	AAgCCACAACgggCTATTgT
76			BR_L525R_09S	AgCCACAACgggCTATTgTT
77			BR_L525R_13S	CACAACgggCTATTgTTACC
78			BR_L525R_03S	AgCCACAACgggCTATTgTTA
79			BR_L525R_05S	CCACAACgggCTATTgTTACC
80			BR_L525R_01A	TAGCCCgTTgTggCTTgTg
81			BR_L525R_02A	CAATAGCCCgTTgTggCTTg
82			BR_L525R_05A	ggTAACAATAGCCCgTTgTgg
83	D594G	1781A>G	BR_D594G_01S	ACAgTAAAAATAggTgGTTTTgg
84			BR_D594G_02S	TAAAAATAggTgGTTTTggTCTAg
85			BR_D594G_03S	ATAggTgGTTTTggTCTAgCTA
86			BR_D594G_01A	ACCAAACACCTATTTTACTg
87			BR_D594G_02A	CTAgACCAAACACCTATTTTTA
88			BR_D594G_03A	gTAgCTAgACCAAACACCT
89			BR_D594G_05S	ggTggTTTTggTCTAgCTACA
90			BR_D594G_04A	TAgACCAAACACCTATTTTAC
91			BR_D594G_07S	AAAATAggTgGTTTTggTCTAgC
92			BR_D594G_08S	AAAATAggTgGTTTTggTCTAgC
93	V600R	1798_1799 GT>AG	BR_V600R_01S	gTCTAgCTACAAGgAAATCTC
94			BR_V600R_02S	CTAgCTACAAGgAAATCTCgAT
95			BR_V600R_03S	gCTACAAGgAAATCTCgATggA
96			BR_V600R_01A	gAgATTTCCTTgTAgCTAgAC
97			BR_V600R_02A	ATCgAgATTTCCTTgTAgCTAg
98			BR_V600R_03A	TCCATCgAgATTTCCTTgTAgC

10

20

【0054】

本明細書における腫瘍は、B R A Fを発現するいずれかのがん、悪性腫瘍、悪性新生物、肉腫又は腫瘍である。本発明の方法又はキットの対象となるがんは、肺がん、胃がん、大腸がん（直腸・結腸がん）又はメラノーマの場合があるが、これらに限られない。

30

【0055】

本明細書における治療薬は、ヒトB R A Fの突然変異を検出することにより治療効果を予測することができる全ての治療薬を指し、B R A Fが介在するシグナル伝達系阻害剤、すなわち、E G F R阻害剤、M E K阻害剤、P I 3 K阻害剤、V E G F阻害剤、B R A F阻害剤及びこれらのいずれかの組合せが含まれる。E G F R阻害剤には、セツキシマブ（Cetuximab）、パニツムマブ（Panitumumab）を含むがこれらに限られない抗E G F R抗体薬のほか、ゲフィチニブ（Gefitinib）、エルロチニブ（Erlotinib）、ラパチニブ（Lapatinib）、アファチニブ（Afatinib）を含むがこれらに限られないE G F Rのチロシンキナーゼ阻害活性を有する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物が含まれる。M E K（M A P K／E R Kキナーゼ）阻害剤には、トラメチニブ（Trametinib）、セルメチニブ（Selumetinib）、M E K 1 6 2を含むがこれらに限られないM E Kのキナーゼ阻害活性を有する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物が含まれる。P I 3 K（ホスホイノシチド3-キナーゼ）阻害剤には、ペリフォシン（Perifosine）、イデラリシブ（Idelalisib）、B Y L 7 1 9を含むがこれらに限られないホスホイノシチド3-キナーゼ阻害活性を有する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物が含まれる。V E G F阻害剤には、ベバシズマブ（Bevacizumab）を含むがこれらに限られないV E G F阻害活性を有する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物が含まれる。B R A F阻害剤には、ベムラフェニブ（Vemurafenib）、ダブラフェニブ（Dabrafenib）、エンコラフェニブ（Encorafen

40

50

ib、L G X－8 1 8）を含むがこれらに限られないB R A Fキナーゼ阻害活性を有する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物が含まれる。また、B R A F阻害剤は、B R A Fに加えて、A R A F及び／又はC R A Fを阻害してもよい。E G F R阻害剤、及び／又は、E G F R阻害剤以外のB R A Fが介在するシグナル伝達系阻害剤と併用される場合がある化学療法剤には、フルオロウラシル、イリノテカン、フォリン酸、オキサリプラチン、カペシタビン、ロイコボリン、テガフル・ウラシル、ギメラシル、オテラシルカリウム及びトリフルリジン・チピラシル（T A S－1 0 2）が含まれるが、これらに限られない。E G F R阻害剤以外のB R A Fが介在するシグナル伝達系阻害剤、及び／又は、化学療法剤は、さらに、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、P D－1、P D－L 1、C T L A－4の活性を阻害する抗体、組換えタンパク質、又は低分子化合物と併用される場合がある。

10

【0056】

現在臨床現場では、B R A F V 6 0 0変異により活性化されているメラノーマに対してだけでなく大腸がんに対してもM E K阻害剤が積極的に投与される場合がある。B R A Fの下流のM E Kを阻害することによって、生存シグナル伝達を止めることが期待されるためである。同様に、5 2 4、5 2 5、4 8 6、5 9 4位など6 0 0位以外が置換されたB R A F変異がんに対しても、M E K阻害剤を投与することが有効であると考えられる。また、大腸がんにおいては、B R A F変異がんに対して、E G F R阻害剤及びB R A F阻害剤に、P I 3 K阻害剤又はM E K阻害剤をさらに併用して投与されその安全性と有効性が報告されている（Van Geel,R. et al. Abstract #3514、Bendell, J.C. et al. Abstract #3515、2014 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology）。大腸がんにおいては、E G F Rの発現量が多くE G F Rからの生存シグナルがメラノーマと比較してより強いことから、P I 3 K阻害剤又はM E K阻害剤をE G F R阻害剤及びB R A F阻害剤とを併用することにより、治療効果があがったと考えられる。本発明が提供するヒトB R A Fの体細胞突然変異を有する腫瘍についても、同様に、M E K阻害剤とE G F R阻害剤との併用治療が施される場合がある。

20

【0057】

本発明において患者の生体サンプルは、腫瘍組織サンプル、体液サンプル、分泌物サンプル及び排泄物サンプルからなる群から選択される少なくとも1つのサンプルの場合がある。腫瘍組織サンプルは、患者から手術又は生検により切除された新鮮ながん組織と、該新鮮ながん組織を凍結保存した標本とを含むが、これらに限られない。またホルムアルデヒドを37%以上含む水溶液（ホルマリン原液）を精製水で10倍に希釈した10%ホルマリン固定液や、リン酸バッファーで10倍に希釈した10%リン酸緩衝ホルマリン固定液で固定された標本であってもよい。ホルマリン固定後、常法に従ってパラフィンに包埋される場合がある。簡潔には、ホルマリン固定されたがん組織を50～100%の濃度のエタノール水溶液系列に順次浸漬して脱水し、100%エタノールに到達すると、次は、エタノールとキシレンとの混合液の系列に順次浸漬して溶媒をキシレンに置換する。その後、パラフィンのキシレン溶液の系列に順次浸漬する。パラフィンのキシレン濃度が下がると、パラフィンが融解する60℃の恒温槽に移す。最終的に100%パラフィンを組織に浸透させてから、パラフィンの温度を下げて固化させる方法などがあげられるが、これに限定されない。体液サンプルは、患者から採取された全血、血清、血餅、血沈、血漿、リンパ液、組織液等の体液のサンプルを含むが、これらに限られない。分泌物サンプルは、汗腺、涙腺、乳腺、唾液腺、その他の外分泌腺の分泌物と、胃液、胆汁その他の消化腺の分泌物とを含むが、これらに限られない。排泄物サンプルは、糞尿、鼻汁、喀痰、その他の排泄物を含むが、これらに限られない。

30

40

【0058】

B R A F変異の有無は、B R A FをコードするD N A、R N A、及び／又はB R A Fタンパク質における塩基又はアミノ酸置換の有無を確認することにより、変異の有無を確認できる。

本発明における生体組織サンプルからのD N A又はR N A抽出には、A b s o l u t e l

50

y RNA FFPE kit (アジレント・テクノロジー株式会社)、NucleoSpin (登録商標) DNA FFPE XS (MACHEREY-NAGEL GmbH、タカラバイオ株式会社)、WaxFree (商標) Paraffin Sample DNA Extraction Kit (TrimGen Corporation、フナコシ株式会社)、DNA Isolater PS-Rapid Reagent (和光純薬工業株式会社) その他の商業的に入手可能なキットを使用して、製造者の指示書に従って操作することによってDNA解析に供するのに十分な品質のDNAを得ることができる方法があげられるが、これに限定されない。簡潔には、パラフィン包埋薄切標本をキシレン、d-リモノエン等の脱パラフィン剤で処理してパラフィンを溶解除去し、該脱パラフィン剤をエタノール等で洗浄した後、プロテイナーゼK消化により核酸を可溶化する。代替的には、界面活性剤によりパラフィン包埋薄切標本から直接核酸を可溶化する。その後、フェノール、グアニジンチオシアン酸塩等のタンパク質変性剤でタンパク質を変性させて水相から除去し、水相に残った核酸をシリカ又は樹脂で吸着分離する。生体サンプルからのRNA抽出には、DNアーゼ (デオキシリボヌクレアーゼ) I 等のDNA分解酵素処理が施される場合がある。

10

【0059】

腫瘍からのタンパク質は、524位等を置換されたBRAFに特異的に結合する抗体を用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーションなどによって、変異の検出をすることができる。

【0060】

20

本明細書において、BRAFのG469、L485、Q524、L525、D594及びV600における変異は、配列番号1の野生型BRAFのアミノ酸配列におけるそれぞれの箇所のアミノ酸残基と比較して、異なるアミノ酸に置換されているものを含む。したがって本明細書において、G469、L485、Q524、Q524、L525、D594及びV600の用語には、それぞれ、G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600Rを含む。本明細書において、アミノ酸残基の置換を起こすヒトBRAF遺伝子の突然変異塩基とは、配列番号1の野生型BRAFのアミノ酸残基の置換を起こす突然変異体塩基配列のうち、配列番号1の野生型BRAFの塩基配列と異なる塩基をいう。あるアミノ酸残基の置換の有無を検出するためには、当該突然変異塩基を含む少なくとも1個、好ましくは2個又は3個分のオリゴヌクレオチドの塩基配列を決定

30

【0061】

本発明におけるヒトBRAF遺伝子の突然変異の検出は、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択されるアミノ酸残基の置換突然変異があるかどうかを検出することができることを条件として、いかなるやり方で行われてもかまわない。G469、L485、Q524、L525、D594及びV600に加えて、A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、G464、G466、G469、V483、T521、V528、E586、D587、F595、G596、L597、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738及びC748を含むが、これらに限定されない、既知のヒトBRAFの置換突然変異があるかどうかを併せて検出できてもかまわない。抽出されたDNAはシーケンス解析の鋳型となるDNAが濃縮される場合がある。DNAの濃縮には、SureSelect XT AUTO カスタムキャプチャライブラリ(アジレント・テクノロジー株式会社)その他のキットを用いる場合がある。

40

【0062】

前記ヒトBRAF遺伝子の突然変異の検出は、ヒトBRAF遺伝子の少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列の決定か、ヒトBRAF遺伝子の少なくとも1つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドの特異的増

50

幅か、ヒト B R A F タンパク質の前記少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換を含むペプチドの検出かにより行われる場合がある。

【0063】

本発明における別の態様は、B R A F 遺伝子における G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 の塩基部位を含む D N A を増幅するように設計されたフォワードプライマー、及びリバースプライマーを含む試薬である。プライマーの長さは、通常 1 0 b p ～ 1 0 0 b p であり、好ましくは 1 5 b p ～ 3 5 b p、さらに好ましくは 1 9 b p ～ 3 1 b p である。プライマーは、多型部分を含む B R A F 遺伝子の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

【0064】

プローブは、B R A F 遺伝子の多型を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、野生型の B R A F 遺伝子、あるいは G 4 6 9、L 4 8 5、Q 5 2 4、L 5 2 5、D 5 9 4 及び V 6 0 0 に変異を有する B R A F 遺伝子と特異的にハイブリダイズするようなプローブである。プローブの長さは、通常 1 0 b p ～ 1 0 0 b p であり、好ましくは、1 5 b p ～ 3 0 b p、さらに好ましくは 1 8 b p ～ 2 4 b p である。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、検出する B R A F 遺伝子を含む D N A、又は変異を有する B R A F 遺伝子に対し、完全に相補的である必要はない。

【0065】

前記ヒト B R A F 遺伝子の突然変異の検出を、ヒト B R A F 遺伝子の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換をコードするオリゴヌクレオチドの塩基配列の決定により行う場合には、サンガー法による従来技術の核酸シーケンシング法その他、以下の実施例で使用されたとおりのイルミナ株式会社の HiSeq1500/2000/2500、Miseq や NextSeq 500、ライフテクノロジー社の Ion PGM/Proton、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社のゲノムシーケンサー FLX 等の次世代シーケンシングシステムが用いられる場合がある。がん組織標本から抽出・精製された鋳型 D N A は、製造者の指示書に従って、各製造者が用意する試薬キットで処理され、配列決定機器に装架される。塩基配列の決定によるヒト B R A F 遺伝子の突然変異の検出は、タンパク質全長の全てのアミノ酸置換突然変異を検出できる利点があるが、特定の体細胞突然変異を起こした細胞ががん組織中に占める割合が少ないと検出できないという検出感度の問題がある。

【0066】

前記ヒト B R A F 遺伝子の突然変異の検出を、ヒト B R A F 遺伝子の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドの特異的合成により行う場合には、それぞれのアミノ酸残基の位置ごとにプライマーやプローブ等の検出用オリゴヌクレオチドを用意する必要がある。前記ポリヌクレオチドの特異的合成が生体サンプルから抽出された R N A を鋳型とする場合には、R N A 依存 R N A 合成酵素又は R N A 依存 D N A 合成酵素（逆転写酵素）が用いられる。前記ポリヌクレオチドの特異的合成が生体サンプルから抽出された D N A を鋳型とする場合には、D N A 依存 D N A 合成酵素、あるいは、D N A 依存 R N A 合成酵素が用いられる。該検出用オリゴヌクレオチドの配列は、前記置換アミノ酸をコードするオリゴヌクレオチドを含むか、あるいは、該オリゴヌクレオチドを 1 対のプライマーが挟むように配列番号 2 の塩基配列から選択される場合がある。

【0067】

前記ヒト B R A F 遺伝子の突然変異の検出を、ヒト B R A F 遺伝子の少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換をコードするポリヌクレオチドの全部または一部を増幅し、プローブオリゴヌクレオチドによって検出する場合は、該オリゴヌクレオチドを 1 対のプライマーが挟むように配列番号 2 の塩基配列から選択される場合がある。

【0068】

前記検出用オリゴヌクレオチドは、本発明の患者の生体サンプル中の D N A 又は R N A と特異的に雑種形成を起こすことを条件として、いかなる長さであっても、いかなる天然ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を含むものであってもかまわない。前記検出用オリ

10

20

30

40

50

ゴヌクレオチドはヌクレオチドが少なくとも12、13、14、15、16、17個又は18個の長さの場合がある。また、塩基配列の決定により行う場合に比べて検出感度が高い方法で行ってもよい。パイロシーケンシング法、SURVEYORアッセイ、BEAMing技術、リアルタイムPCR、rhPCR法等が利用可能である。

【0069】

本明細書において、「検出用オリゴヌクレオチドが、本発明の患者の生体サンプル中のDNA又はRNAと特異的に雑種形成を起こす」とは、以下の実験系で決定される。本発明の患者の生体サンプル中のDNA又はRNAを、直接に、あるいは、アガロース電気泳動により分子量に応じて分離したうえで、毛管現象又は電気泳動によりニトロセルロースフィルターその他の固相に不動化する。該固相に不動化された患者の生体サンプル中のDNA又はRNAと同じモル数の前記検出用オリゴヌクレオチドが不動化された固相を陰性対照とし、前記検出用オリゴヌクレオチドと相補的なヌクレオチド配列のオリゴヌクレオチドを患者の生体サンプル中のDNA又はRNAと同じモル数で不動化された固相を陽性対照とする。これらの固相をストリンジェントな条件で雑種形成させる。ここで「ストリンジェントな条件」とは、Sambrook、J. 及びRussell、D. W.、Molecular Cloning A Laboratory Manual 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に説明される以下の実験条件で行うことを指す。6× SSC及び0.2% SDSからなる溶液で前洗浄する。前記検出用オリゴヌクレオチドを放射性同位元素その他の標識物質で標識したプローブと前記固相に不動化されたDNA、RNA又はオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーション反応を6× SSC及び0.2% SDSからなる溶液中で65°C、終夜行う。その後前記固相を1× SSC及び0.1% SDSからなる溶液中で65°C、各30分ずつ2回洗浄し、0.2× SSC及び0.1% SDSからなる溶液中で65°C、各30分ずつ2回洗浄する。最後に前記固相に残存するプローブの量を前記標識物質の定量により決定する。「前記検出用オリゴヌクレオチドが、本発明の患者の生体サンプル中のDNA又はRNAと特異的に雑種形成を起こす」とは、本発明の患者の生体サンプル中のDNA又はRNAを不動化した固相に残存するプローブの量と陰性対照の固相に残存するプローブの量との差が、前記陽性対照の固相に残存するプローブの量と陰性対照の固相に残存するプローブの量との差の、少なくとも25%、又は、少なくとも50%、又は、少なくとも75%以上であることを指す。

【0070】

本明細書において、「抗体」には、いずれかの動物の免疫グロブリンIgG、IgM、IgE、IgA及びIgDを含む。「抗体の断片」には、いずれかの動物の免疫グロブリンの抗原結合部分、すなわち、軽鎖及び／又は重鎖の可変領域自体か、軽鎖及び／又は重鎖の可変領域を含むFab断片及び／又はF(ab')₂断片か、ラクダ科動物の単ドメイン抗体(ナノボディ)かを含む。「抗体」には、前記抗体の断片を含む融合タンパク質である2重特異的抗体又は多価抗体を含む。

【0071】

本明細書において、「本発明の単離ヒトBRA Fの体細胞突然変異タンパク質又はその単離ペプチド断片に特異的に結合する」とは、同じ量のヒト野生型BRA Fタンパク質又は体細胞突然変異タンパク質を不動化した固相をブロッキングし、同一濃度の抗体又は抗体断片と反応させ、さらに該抗体又は抗原断片に対する標識2次抗体と反応させて、ヒト野生型BRA Fタンパク質又は体細胞突然変異タンパク質を不動化した固相に結合した前記抗体又は抗原断片の量を比較したとき、体細胞突然変異タンパク質を不動化した固相に結合した前記抗体又は抗原断片の量が、ヒト野生型BRA Fタンパク質又は他の体細胞突然変異タンパク質を不動化した固相に結合した前記抗体又は抗原断片の量より2倍、又は、5倍、又は、10倍多いことを指す。

【0072】

Lumindex(登録商標)システムを利用したxMAP(登録商標)テクノロジーの

ような蛍光マイクロビーズを使った多項目同時測定技術が利用可能である。当該技術では、測定試料（ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE：Formalin-Fixed Paraffin-Embedded）組織又は新鮮凍結組織）から抽出したゲノムDNAを検体として、ビオチン標識プライマーを含むマスターミックスとTaq DNAポリメラーゼによりヒトBRAF遺伝子のG469、L485、Q524、L525、D594及びV600を含む領域をPCR増幅させる。前記領域に加えて、A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、G464、G466、G469、V483、T521、V528、E586、D587、F595、G596、L597、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738及びC748を含むが、これらに限定されない、既知のヒトBRAFのアミノ酸置換突然変異を含む領域をPCR増幅させる場合もある。ハイブリダイゼーション緩衝液中にてPCR増幅産物とビーズミックスを反応させ、ビーズミックスに含まれる蛍光ビーズ上のプローブとPCR増幅産物をハイブリダイズさせる。ビーズミックスには、野生型（WT）ビーズと前記アミノ酸置換を伴う突然変異塩基を含むオリゴヌクレオチドに対応するプローブを固相した変異型ビーズが含まれる場合がある。また、BRAF遺伝子の突然変異塩基以外の領域と相補的なプローブを対照として用いることもできる。ビーズを洗浄後、リン酸緩衝液中にて蛍光標識タンパク質、例えば、SA-PE（フィコエリスリン標識ストレプトアビジン）とビーズ・PCR増幅産物複合体を反応させ、PCR増幅産物を蛍光標識する。フローサイトメトリーの原理を利用したLuminex 100/200 システムにより、ビーズと前記蛍光標識タンパク質の蛍光を測定し、ヒトBRAF遺伝子のアミノ酸置換突然変異を検出する。

10

20

【0073】

本発明のヒトBRAF遺伝子の突然変異の検出には、配列番号3ないし11の塩基配列からなるか、あるいは、配列番号3ないし11の塩基配列を含むプライマーが用いられる場合がある。配列番号3及び4、配列番号5及び6、配列番号7及び8、配列番号9及び11、及び、配列番号10及び11の塩基配列からなるプライマーの対から選択される少なくとも1対のプライマーか、あるいは、配列番号3及び4、配列番号5及び6、配列番号7及び8、配列番号9及び11、及び、配列番号10及び11の塩基配列を含むプライマーの対から選択される少なくとも1対のプライマーが用いられる場合がある。本発明のヒトBRAF遺伝子の突然変異の検出には、配列番号12ないし84の塩基配列からなる群から選択される少なくとも1種類の塩基配列からなるプローブか、あるいは、配列番号12ないし84の塩基配列からなる群から選択される少なくとも1種類の塩基配列を含むプローブかが用いられる場合がある。

30

【0074】

前記ヒトBRAF遺伝子の突然変異の検出を、ヒトBRAFタンパク質の前記少なくとも1つのアミノ酸残基の置換を含むペプチドの検出により行う場合には、G469、L485、Q524、L525、D594及びV600からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基が置換したヒトBRAFタンパク質に特異的に結合する抗体が用いられる場合がある。該抗体は、蛍光in situハイブリダイゼーション法、HRP重合ポリマー結合2次抗体法その他の高感度な抗体検出法により検出される場合がある。質量分析イメージング技術その他の微量生体サンプルの質量分析により、前記アミノ酸残基が置換したBRAFタンパク質の断片ペプチドが検出される場合もある。

40

【0075】

本発明の腫瘍の治療方法において、前記ヒトBRAFの突然変異が検出された患者には、BRAFが介在するシグナル伝達系阻害剤であってEGFR以外のシグナル伝達系阻害剤を含む処方投与するステップでは、BRAF阻害剤エンコラフェニブ（Encorafenib、LGX818）及びセツキシマブ（Cetuximab）か、BRAF阻害剤エンコラフェニブ（Encorafenib、LGX818）、セツキシマブ（Cetuximab）及びPI3K阻害剤BYL719（GSK212）か、BRAF阻害剤ダブラフェニブ（Dabrafenib）及びパニツムマブ（Panitumumab）か、BRAF阻害剤ダブラフェニブ（Dabrafenib）、パニツムマブ

50

(Panitumumab) 及び M E K 阻害剤トラメチニブ (Trametinib) か、F O L F O X I R I (Infusional 5-FU+LV+IRI+OX) か、F O L F O X I R I 及びベバシズマブ (Bevacizumab) かを含むが、これらに限られない処方投与する場合がある。具体的な推奨用量は、当業者に周知であり、以下に推奨用量の例を挙げるが、これらに限定されない。B R A F 阻害剤エンコラフェニブ (Encorafenib、L G X 8 1 8) : 2 5 0 m g。セツキシマブ (Cetuximab) : 初回のみ 4 0 0 m g / m²、1 2 0 分以上かけて点滴静注、その後は 2 5 0 m g / m²、6 0 分以上かけて点滴静注。B Y L 7 1 9 : 2 5 0 m g / 日。ダブラフェニブ (Dabrafenib) : 1 5 0 m g / 日。パニツムマブ (Panitumumab) : 1 回 6 m g / k g (体重) を 6 0 分以上かけて点滴静注。トラメチニブ (Trametinib) : 2 m g。F O L F O X I R I : イリノテカン 1 6 5 m g / m²、オキサリプラチン 8 5 m g / m²、オキサリプラチンと同時に L - ロイコボリン m g / m²、5 - フルオロウラシル 3, 2 0 0 m g / m²、を点滴静注、2 週ごとに繰り返す。ベバシズマブ (Bevacizumab) 5 m g / k g。なお個々の患者への実際の用量は、推奨用量に向けて漸増しながら、用量制限毒性により決定される。これらの処方の他、F O L F O X、C a p e O X、F O L F I R I、F L 及び / 又は C a p e とベバシズマブ (Bevacizumab) との併用処方や、U F T + L V、I R I S、I R I、T A S - 1 0 2 等との併用処方を投与する場合もある。

【0076】

以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

【実施例1】

【0077】

1. 1 B R E A C 試験の対象患者

網羅的遺伝子解析技術を用いた抗 E G F R 抗体薬治療効果予測バイオマーカーの探索研究に関する多施設共同研究 (Biomarker Research for Anti-EGFR Monoclonal Antibodies by Comprehensive Cancer Genomics、以下、「B R E A C 試験」という。) では、2010 年6月から2011年11月に抗EGFR抗体薬を含む治療を受けた大腸がんの症例のうち、以下の適格基準を満たし、以下の除外基準に該当しない 1 8 4 例を解析対象とした。本解析の対象は、実地臨床で抗 E G F R 抗体薬を投与された症例であり、治療が有効であった群から無効であった群を含む連続的な症例である。

【0078】

B R E A C 試験の適格基準

- (1) 組織学的に大腸原発の腺がんと確認されている
- (2) 切除不能・進行再発大腸がんである
- (3) K R A S 遺伝子型が野生型である又は不明 (治療開始後の判明でも可能)
- (4) 治療開始前 4 2 日以内にベースラインの C T 検査を行っている
- (5) 測定可能な病変を少なくとも 1 つ以上有する
- (6) 2 0 1 0 年 6 月から各施設倫理審査委員会承認日までにセツキシマブあるいはパニツムマブを含む治療を受けた
- (7) セツキシマブあるいはパニツムマブを含む治療開始後 3 ヶ月以内に、少なくとも 1 回以上の画像診断を受けた
- (8) フルオロピリミジン不応性又は再投与困難
- (9) イリノテカン不応性
- (10) オキサリプラチン不応性又は再投与困難
- (11) 年齢 2 0 歳以上
- (12) P S : 0 ~ 2 (ECOG performance status score)
- (13) セツキシマブ又はパニツムマブの投与直前の検査で下記のように主要臓器機能が保持されている

- (i) 白血球数 : 2, 0 0 0 / m m³ 以上 1 2, 0 0 0 / m m³ 未満

(i i) 血小板数： $\geq 75,000/\text{mm}^3$

(i i i) ヘモグロビン： $\geq 8.0\text{ g/dL}$

(i v) 血清総ビリルビン： $\leq$ 施設正常値上限 (ULN) の3倍

(v) AST (GOT) 及び ALT (GPT)： $\leq$ 施設正常値上限 (ULN) の3倍
(肝転移を有する症例は5倍以下とする)

(v i) 血清クレアチニン： $\leq$ 施設正常値上限 (ULN) の2倍

(14) 十分なホルマリン固定パラフィン包埋組織標本 (以下、「FFPE 標本」という。) があること

(15) セツキシマブ単独或いはイリノテカンベースの化学療法にセツキシマブを併用した、あるいはパニツムマブ単独或いはイリノテカンベースの化学療法にパニツムマブを併用した、いずれかの治療を受けた患者

10

【0079】

BREAC 試験の除外基準

セツキシマブ又はパニツムマブを含む治療前の検査で下記の除外基準を満たすものを、除外する。

(1) 活動性の重複がんを有する

(2) 重篤な感染症を合併している

(3) 処置が必要な体腔液 (胸、腹水及び心嚢水など) を有する

(4) 間質性肺炎又はその既往歴及び肺線維症を有する

(5) その他、担当医師が本研究の対象として不適当と判断した症例

20

(6) 試料等を研究に利用することを文書等で拒否している

【0080】

1. 2 ターゲットシーケンス解析

BREAC 試験に参加する各施設の倫理審査委員会の承認 (国立がん研究センター倫理審査委員会の承認番号：2011-137) の下、文書による同意を得た患者の大腸がんのホルマリン固定パラフィン包埋組織から、アジレント・テクノロジー株式会社が提供するプロトコールでDNAを抽出した。抽出されたDNAは、任意の遺伝子領域をハイブリダイズするSureSelect XT AUTO カスタムキャプチャライブラリ (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて、シーケンス解析の鋳型となるDNAが濃縮された。カスタムライブラリにはBRA F 遺伝子、K R A S 遺伝子、N R A S 遺伝子のコーディングエクソンすべてが含まれていた。TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS (イルミナ株式会社) を用いて、DNAクラスターが作成された。該DNAクラスターが、HiSeq1500 (イルミナ株式会社) においてTruSeq SBS Kit v3-HS (イルミナ株式会社) を用いる塩基配列決定に供された。

30

【0081】

1. 3 統計解析の対象となる患者の臨床背景

最終的に基準を満たし、塩基配列を決定することが可能であった150例を対象として、抗EGFR抗体薬の治療効果と相関する遺伝子変異を探索した。

150例の臨床背景は、男性87例及び女性63例、年齢中央値が63.5歳 (28-85歳)、performance status が0、1及び2の症例数は、それぞれ、81、65及び4例であり、セツキシマブ又はパニツムマブを投与された症例は、それぞれ、106又は44例であった。また、無増悪生存期間 (Progression Free Survival、以下、「PFS」という。) 中央値は4.0ヶ月、全生存期間 (Overall Survival、以下、「OS」という。) 中央値は12.4ヶ月、奏効率 (Response Rate、以下、「RR」という。) は21%であった。

40

【0082】

1. 4 BRA F 遺伝子変異

BRA F 遺伝子は、大腸がんではV600E変異が主要な変異であることが知られており、本試験においてもV600E変異は9例 (6.0%) から検出された。さらにV600E以外の変異 (G469A (1例)、L485F (1例)、Q524L (1例)、L5

50

25R(1例)、D594G(2例)、V600R(1例))が合計7例(4.7%)から検出された。

【0083】

1.5 BRAF遺伝子変異と抗EGFR抗体薬の治療効果

以下、本明細書で示す解析結果は、十分な追跡期間が終了した後の、成熟したPFS及びOSに対するものである。

(i)RAS野生型(RAS W)対RAS変異型(RAS M、図1、2における薄灰色の実線対破線)」、

(ii)「RAS/BRAF V600E野生型(RAS/BRAF W)対BRAF V600E変異型(BRAF V600E M、図1、2における黒の実線対破線)」、及び

(iii)「RAS/BRAF野生型(RAS/BRAF W)対BRAFのその他の突然変異(G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600R)とを含むBRAF変異型(BRAF Other M、図1、2における濃灰色の実線対破線)」の3通りの分類と有効性エンドポイント(PFS、OS、奏効割合(response rate、以下「RR」という。)、病勢制御率(disease control rate、以下、「DCR」という。)等)の関連について統計学的な検討を行った。

【0084】

なお、RAS野生型(RAS W)とは、KRAS及びNRASのいずれにも体細胞突然変異が検出されない腫瘍を意味する。RAS変異型(RAS M)とは、12位、13位、59位、61位、117位又は146位のアミノ酸残基が置換する体細胞突然変異がKRAS又はNRASの少なくともいずれか1つに検出される腫瘍を意味する。RAS/BRAF V600E野生型(RAS/BRAF W)とは、RAS野生型かつBRAF V600E変異がない腫瘍を意味する。BRAF V600E変異型(BRAF V600E M)とは、RAS野生型かつBRAF V600E変異がある腫瘍を意味する。RAS/BRAF野生型(RAS/BRAF W)とは、RAS野生型かつBRAFに体細胞突然変異がない腫瘍を意味する。BRAFのその他の突然変異(BRAF Other M)とは、RAS野生型かつBRAF G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G又はV600Rのいずれかに体細胞突然変異がある腫瘍を意味する。

【0085】

1.5.1 無増悪生存期間(PFS)の解析結果

図1にPFSのKaplan-Meier曲線を示した。変異型の患者集団のPFS(破線)及び野生型の患者集団のPFS(実線)はいずれの分類においても同等であった。従来から抗EGFR抗体薬の無効因子として知られているRAS変異型の患者集団と同様、BRAF V600E変異型と、BRAFのその他の変異型との患者集団は、抗EGFR抗体薬の治療効果が期待できない可能性が示唆された。

【0086】

1.5.2 全生存期間(OS)の解析結果

図2にOSのKaplan-Meier曲線を示した。変異型の患者集団(破線)においては、PFSと異なり、BRAFのその他の変異型(濃灰色破線)において予後良好の傾向を示した。野生型の患者集団の予後はいずれの分類においても同等であった。特に、RAS/BRAF野生型に集団を限定した場合、程度は弱いものの、OSは改善の傾向を示した。

【0087】

1.5.3 奏効率、病勢制御率、腫瘍縮小率、PFS及びOSの中央値の解析結果

表2に、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン(response evaluation criteria in solid tumours)改訂版(バージョン1.1、Eisenhauer, E.A.ら、Eur J Cancer 45 (2009) 228-247)による治療への反応の定義を示す。

【0088】

【表 2】

C R (Complete Response、完全奏効)	すべての標的病変の消失かつ標的、非標的にかかわらずリンパ節短径が 10mm 未満であること。
P R (Partial Response、部分奏効)	ベースライン長径の和と比較して標的病変の長径の和が 30%以上減少。
S D (Stable Disease、安定)	PR に相当する縮小がなく、PD に相当する増大がない。
P D (Progressive Disease、進行)	ベースライン又は治療開始以降に記録された最小の長径の和と比較して標的病変の長径の和が 20%以上増加。但し、20%以上の増加であっても少なくとも 5mm 以上の増加があること。新病変の出現。

10

【0089】

それぞれ B R A F 遺伝子に変異があった患者における変異型と、その患者の最良の反応を表 3 に示す。

【0090】

【表 3】

患者ID	変異型	最良の反応
1	L525R	SD
2	L485F	PD
3	G469A	SD
4	D594G	SD
5	V600R	SD
6	D594G	SD
7	Q524L	PD

20

【0091】

表 4 に、奏効率 (R R)、病勢制御率 (D C R)、腫瘍縮小率 (% s h r i n k)、P F S 及び O S の中央値の解析結果を示す。ここで奏効率 (R R) とは、ある治療に対する反応が C R 及び P R であった症例の百分率をいう。また病勢制御率 (D C R) とは、ある治療に対する反応が C R、P R 及び S D であった症例の百分率をいう。D C R には S D 症例 (ベースラインから 20 % 未満の腫瘍増大) が含まれるため、単純に腫瘍が縮小した割合に対する解析も行った。

【0092】

30

【表 4】

	野生型			変異型		
	RAS/BRAF	RAS/BRAFV600E	RAS	BRAF その他	BRAF V600E	RAS
N	94	101	110	7	9	40
RR (%)	31.9	29.7	27.3	0.0	0.0	2.5
DCR (%)	85.1	84.2	79.1	71.4	22.2	30.0
%shrink ^{*1}	74.5	71.3	67.3	28.6	22.2	20.0
%shrink ^{*2}	71.3	68.3	63.6	28.6	11.1	17.5
PFS 中央値	5.9	5.8	5.2	2.4	1.6	2.1
OS 中央値	14.5	14.3	13.9	8.1	4.6	6.3

*1：腫瘍が増大しなかった症例の割合（全く縮小しなかった症例を含む）

*2：腫瘍が一度でも縮小した症例の割合（全く縮小しなかった症例を含まない）

【0093】

表4において、奏効率（RR）はBRAF V600EとBRAFその他変異型とも0%であり、抗EGFR抗体薬による完全奏効が確認できなかった。病勢制御率（DCR）は、BRAF V600E変異型で22.2%、BRAFのその他の変異型で71.4%であった。腫瘍が増大しなかった症例（腫瘍の大きさが変わらない、つまり全く縮小しなかった症例も含む）を示す「%shrink^{*1}」の割合は、それぞれBRAF V600E変異型で22.2%、BRAFのその他の変異型で28.6%であった。腫瘍が一度でも縮小した症例（「%shrink^{*1}」から全く縮小しなかった症例を除外）を示す「%shrink^{*2}」の割合は、それぞれBRAF V600E変異型で11.1%、BRAFのその他の変異型で28.6%であった（図3）。以上の結果から、腫瘍縮小という観点で評価した場合においても、BRAF V600E変異型と、BRAFのその他の変異型（G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600R）を含むBRAF変異型患者集団の除外が有効性の改善に寄与することが確認された。

【0094】

1.5.4 各遺伝子変異の有無によるPFS及びOSの解析

図3Aは、RAS野生型対RAS変異型（RAS W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線を示す。ログランク検定のP値は、それぞれ、0.01%未満又は0.02%であった。図3Bは、RAS野生型かつBRAF600位野生型対RAS変異型又はBRAF V600E変異型（RAS/BRAF V600E W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線を示す。ログランク検定のP値は、それぞれ、0.01%未満又は0.01%であった。図3Cは、RAS野生型かつBRAF野生型対RAS変異型又はBRAF変異型（RAS/BRAF W/M）のPFS及びOSを比較したKaplan-Meier曲線を示す。ログランク検定のP値は、いずれも0.01%未満であった。図3A、B及びCのいずれにおいても、ログランク検定のP値は有意水準5%で統計学的に有意な関連を示した。

【0095】

1.5.5 各遺伝子変異の有無によるPFS、OSのハザード比

これまでの結果はKaplan-Meier曲線やログランク検定に基づく、単変量的なアプローチによる検討であった。PFS又はOSに関連する背景因子が両群間で偏る場合、上記で認められた傾向はアーチファクトである可能性（交絡が生じている可能性）がある。そこで、PFS及びOSについては、以下の表5に記載した背景因子を調整したCoxの比例ハザードモデルを適用し、交絡を調整した場合の、3分類によるハザード比を推定した（表5の第3列「Multivariate Cox」を参照）。いずれにおいても、ハザード比の95%信頼区間の下限が1を上回っており、変異型の患者集団が予後不良の傾向を示した。

【0096】

【表5】

N=150		Univariate Cox		Multivariate Cox	
		HR[95%CI]	p	HR[95%CI]	p
RAS W/M	PFS	3.74[2.48-5.64]	<0.0001	4.66 [2.89-7.51]	<0.0001
	OS	2.02[1.39-2.94]	0.0003	2.67 [1.73-4.13]	<0.0001
RAS BRAF V600E W/M	PFS	3.30[2.29-4.76]	<0.0001	6.24 [3.90-9.98]	<0.0001
	OS	2.17[1.52-3.10]	<0.0001	3.41[2.19-5.32]	<0.0001
RAS/BRAF W/M	PFS	3.49[2.43-5.00]	<0.0001	5.43 [3.45-8.55]	<0.0001
	OS	2.14[1.51-3.04]	<0.0001	3.37 [2.20-5.16]	<0.0001

10

—強制的に含めた変数: 性別, PS, 原発部位, CPT併用有無

—症例数が限られているため以下は変数減少法を適用:

・原発巣有無

・術前術後化学療法有無

・同時性/異時性

・提出検体の組織型

・既往歴

・併存疾患

・前治療不応/不耐

・年齢

※ 原発部位の定義

—右: 上行 + 横行

—左: 下行 + S状 + Rs

—直腸: Ra + Rb

20

【0097】

これまでに示した解析結果は、BRAFのV600E変異型と、BRAFのその他の変異型（G469A、L485F、Q524L、L525R、D594G及びV600R）からなる群から選択される少なくとも1種類）とが、抗EGFR抗体薬治療効果予測マーカーであることを示している。

【0098】

30

1. 6 BRAF遺伝子変異の機能

Roskoski Jr, R. (Biochemical and Biophysical Research Communications 399: 313-317 (2010)) によれば今回検出されたBRAF遺伝子変異は、すべてタンパク質キナーゼドメインに存在する（457-717位）。V600E変異は活性化変異として知られており、V600R、G469A変異も活性化変異であることが知られている。コドン469、594、600は、活性に重要なP-loop（464-469）やDFG motif/activation segment（594-600）に存在しており、立体構造上は近い位置にある。一方、コドン485、524及び525はこれらの領域から外れており、既知のヒトBRAFタンパク質の構造及び機能についての知識から抗EGFR抗体薬の治療効果との関連は予測できない。

40

【実施例2】

【0099】

ヒト培養細胞における一過性発現系によるBRAF変異タンパク質の機能解析

2. 1 HEK293細胞で発現されたBRAF変異タンパク質の細胞増殖促進シグナル伝達系への影響（1）

EGFがEGFRに結合して発生する細胞増殖促進シグナルは、KRASおよび/またはNRASを介してBRAFに伝達され、BRAFを活性化する。活性化されたBRAFはERK（細胞外シグナル調節キナーゼ、Extracellular Signal-Regulated Kinase）を活性化することでさらに下流に細胞増殖促進シグナルを伝達する。そこで本実験では、BREC試験で検出されたBRAF変異タンパク

50

質がヒト細胞において細胞増殖促進シグナルをBRAFの下流のERKに伝達できるかどうかをBRAF変異タンパク質の一過性発現系で検討した。

【0100】

2. 1. 1 材料及び方法

本実験では以下の試薬が用いられた。

OptiMEM (Gibco、ライフテクノロジーズジャパン株式会社 31985-062)

FUGENE HD トランスフェクション試薬 (プロメガ株式会社、E2313)
ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、Gibco、ライフテクノロジーズジャパン株式会社 11885-084)

プロテアーゼ阻害剤カクテル (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社、P8340)

BCA タンパク質アッセイキット (Pierce、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、#23225)

SuperSep Ace (5-20%) (和光純薬工業株式会社、194-15021)

プレシジョン Plus プロテイン (商標) 2色スタンダード (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、161-0374)

トランスプロット (登録商標) Turbo (商標) ミニ PVDF 転写パック (バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、#170-4156)

抗FLAGマウスモノクローナル抗体 (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社、A8592)

抗p44/42 MAPK (ERK1/2) ウサギ抗体 (CSTジャパン株式会社、#4695)

抗リン酸化p44/42 MAPK (ERK1/2) ウサギ抗体 (CSTジャパン株式会社、#4370)

抗ウサギ抗体HRP結合ヤギ抗体 (CSTジャパン株式会社、#7074)

抗マウス抗体HRP結合ウマ抗体 (CSTジャパン株式会社、#7076)

ECLウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham、GEヘルスケア・ジャパン株式会社)

【0101】

本発明のBRAF変異タンパク質を発現するためのベクターは、自己不活性化タイプレトロウイルスベクターのpQCXIP (クロンテック、タカラバイオ株式会社、631516) で、これは、FLAGタグを融合したBRAFの野生型又は突然変異体遺伝子と、ピューロマイシン耐性遺伝子とをCMVIEプロモーターで駆動する。BRAF発現コンストラクトの作成は、製造者の指示書に従って行った。

【0102】

ヒト胎児腎細胞HEK293はJCRB細胞バンクから入手した。6穴マルチウェルプレートにHEK293細胞を各ウェルあたり 5×10^5 個播種した。37°C、5%CO₂、飽和湿度条件下で終夜培養し、表6に列挙した濃度のプラスミドDNAの10mM Tris-HCl及び1mMEDTAバッファー (TEバッファー、pH8.0) 溶液を用意して、トランスフェクション試薬及びDNAの複合体溶液を表7の組成で調製した。前記FUGENE HD トランスフェクション試薬の製造者の指示書に従って前記複合体溶液を各ウェルあたり150μL添加して、6時間培養した。

【0103】

10

20

30

40

【表 6】

plasmidDNA	[ng/ul]
pQCXIP vector	989
Flag BRAF WT/pQCXIP	973
Flag BRAF V600E	1145
Flag BRAF Q524L/pQCXIP	891
Flag BRAF L525R/pQCXIP	744

【 0 1 0 4 】

10

【表 7】

	Vector	WT	V600E	Q524L	L525R	[μl]
FuGENE	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
DNA	1.5	1.5	1.35	1.65	1.95	
Opti-MEM	144.0	144.0	144.2	143.9	143.6	
Total	150	150	150	150	150	

【 0 1 0 5 】

前記複合体溶液中で6時間の培養後、培地を交換しさらに24時間培養を行い、その後以下の細胞溶解バッファー（50mM Tris-HCl、1% NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム、0.5% SDS、150mM NaCl、2mM EDTA、50mM NaF、1%プロテアーゼ阻害剤カクテル及び1mM オルトバナジウム酸ナトリウム、pH6.8）で溶解、Pierce BCA タンパク質アッセイキットによりタンパク定量を行い、SDS-PAGEサンプルを調製した。

20

【 0 1 0 6 】

製造者の指示書に従い、各レーンあたりタンパク質10μgのサンプルをプレキャストゲルSuperSep Aceに懸架して、SDS-PAGEを行った。泳動終了後、トランスブロット（登録商標）Turbo（商標）転写システム（バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社、#1704150J1）を使用し、添付のプロトコルに従い、ウェスタンブロッティングを行った。ブロッティング終了後のPVDFメンブレンは、5%スキムミルクを添加したTBS（pH7.4）で30分間ブロッキングした後、5%BSAを添加したTBS（pH7.4）で1000倍に希釈した一次抗体と4℃終夜反応させた。0.05% Tween-20を添加したTBSでメンブレンを3回洗浄後、5%BSAを添加したTBSで2000倍に希釈した2次抗体を室温で1時間反応させた。0.05% Tween-20を添加したTBSでメンブレンを3回洗浄後、ECLウェスタンブロッティング検出試薬により検出を行った。検出にはImage Quant LAS4000 mini（GEヘルスケア・ジャパン株式会社）を使用した。

30

【 0 1 0 7 】

2. 1. 2 結果

40

図4は、空ベクター（pQCXIP）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（Q524L及びL525R）を発現するベクターとをトランスフェクションしたHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFLAG抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図4の上段では、FLAGタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図4の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。図4の上段に示すとおり、空ベクター導入細胞を除くBRAF導入した細胞のサンプルでは、BRAFタンパク質（80kDa）に相当するサイズのバンドに抗体が反応した。また図4の下段に示すとおり、空ベクター導入細胞

50

胞のサンプルと、全てのB R A Fを導入した細胞のサンプルとで、E R Kタンパク質（44 k D a）に相当するサイズのバンドに抗体が反応した。全てのサンプルでバンドのデンシティがほぼ同じであったことから、トランスフェクション及びB R A Fの発現はE R Kタンパク質の発現には影響を与えなかった。しかし図4の中段に示すとおり、B R A F発現細胞のサンプルでは、リン酸化E R Kのバンドのデンシティは図4の上段のB R A Fバンドのデンシティに対応していた。そこで、本実験で細胞に導入されたB R A F突然変異体Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 Rは、V 6 0 0 Eと同様に細胞増殖促進シグナルを下流に伝達することができることが明らかになった。

【0108】

10

2. 2 B R A F変異タンパク質による下流への細胞増殖促進シグナル伝達に対する抗E G F R抗体の影響（1）

前節2. 1の実験から、B R A F突然変異体Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 Rは細胞増殖促進シグナルを下流に伝達することができることが明かになった。本節では、これらのB R A F突然変異体によるE R Kの活性化、すなわち、リン酸化が、上流からの細胞増殖促進シグナルに依存するか否かを検証する。そのため、野生型E G F Rを恒常的に発現するH E K 2 9 3細胞株（H E K 2 9 3 E G F R w t）を樹立した。そして、H E K 2 9 3 E G F R w t細胞株にB R A F突然変異体発現ベクターを導入し、B R A Fを一過的に過剰発現させ、異なる濃度の抗E G F R抗体セツキシマブ存在下でのE R Kのリン酸化を検討した。

20

【0109】

2. 2. 1 材料及び方法

本実験では前節の実験で用いた試薬に加えて、セツキシマブ（アービタックス（登録商標）メルクセローノ株式会社）が用いられた。

【0110】

野生型ヒトE G F Rを恒常的に発現するH E K 2 9 3細胞株H E K 2 9 3 E G F R w tは、ネオマイシン耐性遺伝子を有する自己不活性化タイプレトロウイルスベクターのp Q C X I N（クロンテック、タカラバイオ株式会社、6 3 1 5 1 4）に野生型E G F R遺伝子を導入したうえで、製造者の指示書に従って作成した。

前節2. 1と同様に、F u G E N E H D トランスフェクション試薬を用いて、H E K 2 9 3 E G F R w t細胞株にヒトB R A Fの野生型又は突然変異体のプラスミドD N Aをトランスフェクションした。トランスフェクション試薬及びD N Aの複合体溶液中での6時間培養後、培地を交換しさらに20時間培養を行った。その後、異なる濃度（0、0. 5及び5. 0 μ g / m L）のセツキシマブを添加した培地に交換して、さらに2時間培養した。その後、前節2. 1と同様に、ヒトB R A Fの野生型又は突然変異体のプラスミドD N Aを導入した細胞を溶解して、S D S - P A G E及びウェスタンブロッティングを行った。

30

【0111】

2. 2. 2 結果

図5は、空ベクター（V e c t o r）と、野生型ヒトB R A F（W T）、既知のB R A F突然変異体（V 6 0 0 E）及び本発明のB R A F突然変異体（Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 R）を発現するベクターとをトランスフェクションして、異なる濃度（0、0. 5及び5. 0 μ g / m L）のセツキシマブを添加した培地で培養したH E K 2 9 3 E G F R w t細胞株の細胞溶解液をS D S - P A G E法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをF l a g抗体（F L A G）、抗E R K抗体および抗リン酸化E R K抗体で（E R K及びp E R K）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図5の上段では、F l a gタグを融合したB R A Fタンパク質のバンド部分を拡大した。図5の中段及び下段では、E R Kタンパク質のバンド部分を拡大した。図5の上段に示すとおり、空ベクター導入細胞を除くB R A F導入した細胞のサンプルでは、B R A Fタンパク質（80 k D a）に相当するサイズのバンドに抗体が反応した。また図5の下段に示すと

40

50

り、空ベクター導入細胞及びB R A F導入した細胞のサンプルの全てで、E R Kタンパク質（44 kDa）に相当するサイズのバンドに抗体が反応した。全てのサンプルでバンドのデンシティがほぼ同じであったことから、トランスフェクション、B R A Fの発現及びセツキシマブの添加はE R Kタンパク質の発現には影響を与えなかった。しかし図5の中段に示すとおり、空ベクター及び野生型B R A Fを導入した細胞のサンプルでは、セツキシマブの濃度が高いほどリン酸化E R Kのバンドのデンシティが下がった。一方、B R A F突然変異体V 6 0 0 E、Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 Rを導入した細胞のサンプルでは、セツキシマブの濃度が高くなってもリン酸化E R Kのバンドのデンシティは変化しなかった。そこで、本発明のB R A F突然変異体Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 Rは、既知のB R A F突然変異体V 6 0 0 Eと同様に、セツキシマブの濃度が高くなってもE R Kをリン酸化する活性が下がらないので、上流からの細胞増殖促進シグナルに依存しない活性化型B R A F突然変異体であることが示唆された。

10

【0112】

2. 3 H E K 2 9 3細胞で発現されたB R A F変異タンパク質の細胞増殖促進シグナル伝達系への影響（2）

2. 1節と同様の実験を、B R A F変異タンパク質Q 5 2 4 L及びL 5 2 5 Rに加えて、G 4 6 4 V、G 4 6 6 V、G 4 6 9 A、G 4 6 9 V、L 4 8 5 F、N 5 8 1 S、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G、G 5 9 6 R及びV 6 0 0 Rについても行った。

【0113】

2. 3. 1 材料及び方法

20

表7に列挙した濃度のプラスミドDNAのT Eバッファー溶液を用意して、トランスフェクション試薬及びDNAの複合体溶液を表9の組成で調製した。2. 1節と同様に、H E K 2 9 3細胞へのトランスフェクションを行い、プラスミドDNAを導入した細胞を溶解して、S D S－P A G E及びウェスタンブロッティングを行った。

【0114】

【表8】

plasmid DNA	[ng/ul]
pQCXIP vector	1910.6
WT	1892.8
V600E	2030.3
Q524L	1994.4
L525R	2000.2
G464V	1901
G466V	1575
G469A	1838.5
G469V	2219
L485F	1921.8
N581S	989
D594N	973
D594G	1145
G596R	891
V600R	744

30

40

【0115】

【表 9】

	Vector	WT	V600E	Q524L	L525R	[μl]
DNA	1.52	1.54	1.31	1.68	2.02	
FuGENE HD	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
OptiMEM	144.0	144.0	144.2	143.8	143.5	

	G464V	G466V	G469A	G469V	L485F	[μl]
DNA	0.79	0.79	0.74	0.75	0.75	
FuGENE HD	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
OptiMEM	144.7	144.7	144.8	144.7	144.8	

	N581S	D594N	D594G	G596R	V600R	[μl]
DNA	0.79	0.95	0.82	0.68	0.78	
FuGENE HD	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	
OptiMEM	144.7	144.5	144.7	144.8	144.7	

10

【0116】

20

2. 3. 2 結果

図6は、空ベクター（pQCXIP）と、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体（Q524L、L525R、G464V、G466V、G469A、G469V、L485F、N581S、D594N、D594G、G596R及びV600R）を発現するベクターとをトランスフェクションしたHEK293細胞の細胞溶解液をSDS-PAGE法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンをFlag抗体（FLAG）、抗ERK抗体および抗リン酸化ERK抗体で（ERK及びpERK）で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図6の上段では、Flagタグを融合したBRAFタンパク質のバンド部分を拡大した。図6の中段及び下段では、ERKタンパク質のバンド部分を拡大した。図6の中段に示すとおり、野生型ヒトBRAF（WT）、既知のBRAF突然変異体（V600E）及び本発明のBRAF突然変異体の一部（Q524L、L525R、G464V、G469A、G469V、L485F、N581S及びV600R）のサンプルでは、リン酸化ERKのバンドのデンシティは空ベクターのサンプルのデンシティより高かった。しかし、本発明のBRAF突然変異体の残り（G466V、D594N、D594G及びG596R）のサンプルでは、リン酸化ERKのバンドのデンシティは空ベクターのサンプルのデンシティとほぼ同じであった。そこで本発明のBRAF突然変異体のうち、G466V、D594N、D594G及びG596Rは細胞増殖促進シグナルを下流に伝達しない不活性化型BRAF突然変異体であることが示唆された。

30

【0117】

40

2. 4 BRAF変異タンパク質による下流への細胞増殖促進シグナル伝達に対する抗EGFR抗体の影響（2）

本節では、前節2. 3の実験で不活性化型BRAF突然変異体であることが示唆されたG466V、D594N、D594G及びG596Rが、上流からの細胞増殖促進シグナルへの依存性を保持しているかどうかを検証する。

【0118】

2. 4. 1 材料及び方法

表7に列挙した濃度のプラスミドDNAのTEバッファー溶液を用意して、トランスフェクション試薬及びDNAの複合体溶液を表10の組成で調製した。2. 2節と同様に、HEK293 EGFRwt細胞株へのトランスフェクションを行い、プラスミドDNA

50

を導入した細胞を溶解して、S D S - P A G E 及びウェスタンブロッティングを行った。

【0119】

【表10】

	WT	V600E	G466V	D594N	D594G	G596R
DNA [1 µg/µl]	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50
FuGENE HD	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50
OptiMEM	144.0	144.0	144.0	144.0	144.0	144.0

【0120】

2. 4. 2 結果

図7は、空ベクター (V e c t o r) と、野生型ヒト B R A F (W T)、既知の B R A F 突然変異体 (V 6 0 0 E) 及び本発明の B R A F 突然変異体 (G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R) を発現するベクターとをトランスフェクションして、異なる濃度 (0 及び 5. 0 µg/mL) のセツキシマブを添加した培地で培養した H E K 2 9 3 細胞の細胞溶解液を S D S - P A G E 法で分離し、ウェスタンブロッティング法で転写したメンブレンを F l a g 抗体 (F L A G)、抗 E R K 抗体および抗リン酸化 E R K 抗体で (E R K 及び p E R K) で検出した結果のウェスタンブロッティング図である。図7の上段では、F l a g タグを融合した B R A F タンパク質のバンド部分を拡大した。図7の中段及び下段では、E R K タンパク質のバンド部分を拡大した。図7の中段に示すとおり、空ベクター、野生型 B R A F 及び本発明の B R A F 突然変異体 (G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R) を導入した細胞のサンプルでは、セツキシマブの濃度が高いほどリン酸化 E R K のバンドのデンスティが下がった。これに対し、B R A F 突然変異体 V 6 0 0 E を導入した細胞のサンプルでは、セツキシマブの濃度が高くなってもリン酸化 E R K のバンドのデンスティは変化しなかった。そこで、本発明の B R A F 突然変異体 (G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R) は、下流へのシグナル伝達が減弱する不活性化 B R A F 突然変異体ではあるが、上流からの細胞増殖促進シグナルへの依存性を保持していることが示唆された。

【0121】

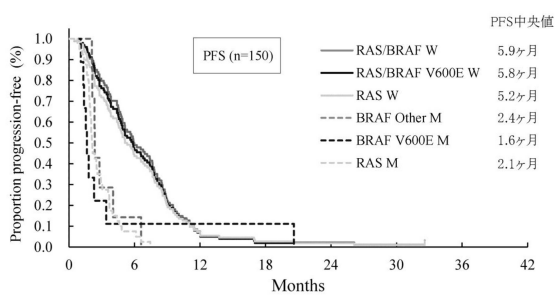
実施例2の結果から、本発明の B R A F 突然変異体 Q 5 2 4 L 及び L 5 2 5 R は、既知の B R A F 突然変異体 V 6 0 0 E と同様に、上流からの細胞増殖促進シグナルに依存しない活性化型 B R A F 突然変異体であることが示唆された。これは、本発明の B R A F 突然変異体 Q 5 2 4 L 及び L 5 2 5 R にはセツキシマブ応答性がないことを意味する。この結果は、実施例1におけるこれらの変異型の患者の抗 E G F R 抗体薬への最良の反応が P D 又は S D という結果 (表3) と一致する。したがって、ヒトを含め生体内でも同様に、Q 5 2 4 L、L 5 2 5 R のいずれかの変異を有する患者には、セツキシマブをはじめ、E G F R 阻害剤による治療の効果は低いことが予想される。

【0122】

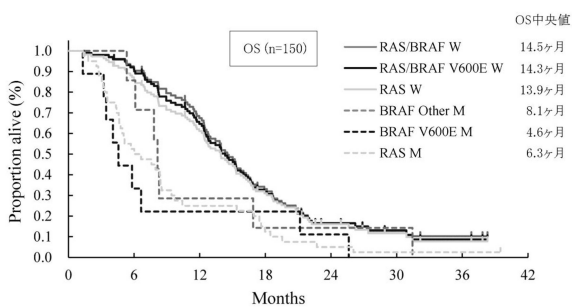
また、本発明の B R A F 突然変異体 G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R は、細胞増殖促進シグナルを下流に伝達しない不活性化型 B R A F 突然変異体ではあるが、上流からの細胞増殖促進シグナルへの依存性を保持していることが示唆された。これは、本発明の B R A F 突然変異体 G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R にはセツキシマブ応答性があることを意味する。しかし、D 5 9 4 G の変異型の患者の抗 E G F R 抗体薬への最良の反応は S D という結果 (表3) であった。すると、本発明の B R A F 突然変異体 G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G 及び G 5 9 6 R にはセツキシマブ応答性があっても、もともと E R K をリン酸化する活性が低いため、セツキシマブ非存在下でも E G F R からのシグナルはほとんど遮断されている可能性がある。あるいは、培養細胞における一過性の過剰発現系では、不活性化型 B R A F 変異体によるセツキシマブ応答性が認められるものの、生体内の環境では、B R A F 以外の R A F ファミリー遺伝子の活性化などによりセツキシマブ耐性を獲得する側副経路が存在する可能性がある。そのため、

D 5 9 4 Gを有する臨床結果で示したように、G 4 6 6 V、D 5 9 4 N、D 5 9 4 G、G 5 9 6 Rの変異を有する患者においては、セツキシマブをはじめ、E G F R阻害剤による治療の効果は低いことが予想される。

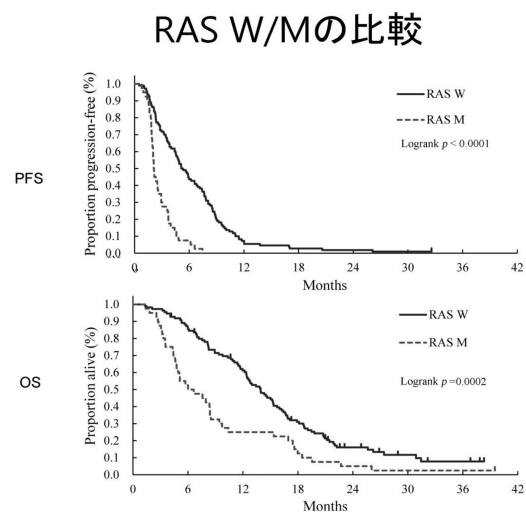
【図 1】



【図 2】

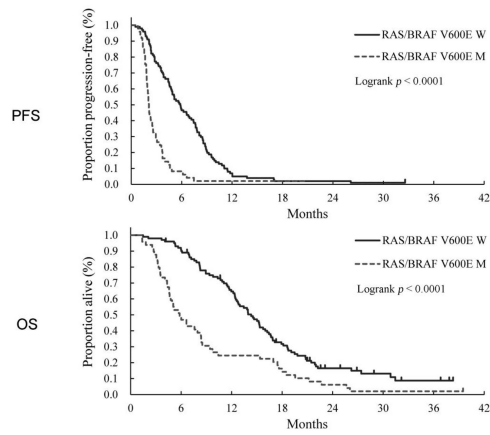


【図 3 A】



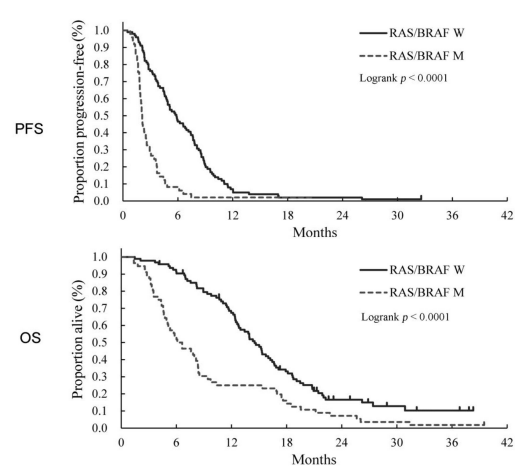
【図 3 B】

RAS/BRAF V600E W/Mの比較

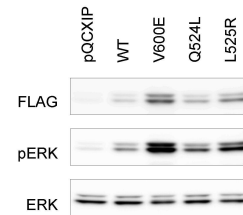


【図 3 C】

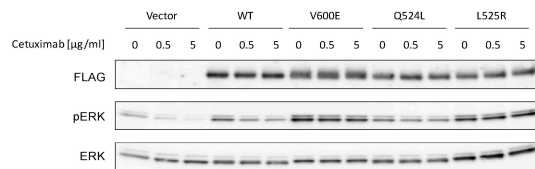
RAS/BRAF W/Mの比較



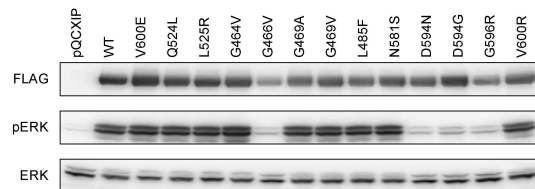
【図 4】



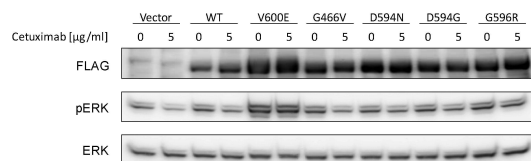
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006858563000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 土原 一哉
千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 吉野 孝之
千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 山中 竹春
千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 野村 尚吾
千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 三牧 幸代
千葉県柏市柏の葉6-5-1 国立研究開発法人国立がん研究センター東病院内
- (72)発明者 鈴木 穰
東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
- (72)発明者 岡田 英樹
福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1 G&Gサイエンス株式会社内
- (72)発明者 中井 智嘉子
福島県福島市松川町美郷四丁目1番地の1 G&Gサイエンス株式会社内

審査官 松原 寛子

- (56)参考文献 LITVAK, Anya M.et al., Journal of Thoracic Oncology, 2014年11月, Vol.9, p.1669-1674
SMITH, Christopher G.et al., Clinical Cancer Research, 2013年, Vol.19, p.4104-4113
久保木恭利他, 個別化医療の新たな展開[大腸癌の個別化医療の新展開], 月刊細胞, 2014年12月20日, Vol.46 No.14 p.687-691
板東英明他, 薬効を予測するバイオマーカー 抗EGFR抗体薬, 癌と化学療法, 2012年, Vol.39, p.1618-1625
ROBERT Roskoski Jr, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010年, vol.399, p.313-317
土原一哉, 国内における臨床シーケンスの展開, 医学のあゆみ, 2014年6月7日, vol.249, p.1133-1138

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/6827
C07K 14/82
C12N 15/11
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq