

(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2010-521153

(P2010-521153A)

(43) 公表日 平成22年6月24日(2010.6.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A Z	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 H O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2009-553623 (P2009-553623)	(71) 出願人	506147331 アムゲン インコーポレイティッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウ ザンド オークス ワン アムゲン セン ター ドライブ
(86) (22) 出願日	平成20年3月11日 (2008. 3. 11)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成21年11月6日 (2009. 11. 6)	(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(86) 国際出願番号	PCT/US2008/003312	(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(87) 国際公開番号	W02008/112269	(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87) 国際公開日	平成20年9月18日 (2008. 9. 18)	(74) 代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(31) 優先権主張番号	60/906, 943		
(32) 優先日	平成19年3月13日 (2007. 3. 13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K - r a s 変異および抗 E G F r 抗体療法

(57) 【要約】

本出願は、K - r a s 変異、変異 K - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および K - r a s 変異を同定する方法に関する。また本出願は、癌を診断する方法、ならびに腫瘍の治療における抗 E G F r 特異的結合剤の有用性を予測するための方法およびキットにも関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に患者が無反応であるかどうかを予測する方法であって、前記患者の腫瘍において K - r a s 変異の有無を決定するステップを含み、前記 K - r a s 変異はコドン 1 2 またはコドン 1 3 またはコドン 2 0 にあり、かつ K - r a s 変異が存在する場合は、前記患者は E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に無反応であることが予測される、方法。

【請求項 2】

腫瘍において K - r a s 変異の有無を決定する前記ステップが、前記腫瘍から K - r a s 核酸を増幅するステップと、前記増幅された核酸の配列を決定するステップとを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記 E G F r ポリペプチド特異的結合剤が、E G F r に対する抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 E G F r に対する抗体が、パニツムマブである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

腫瘍において K - r a s 変異の有無を決定する前記ステップが、変異 K - r a s ポリペプチド特異的結合剤を用いて、前記腫瘍のサンプルにおいて変異 K - r a s ポリペプチドを検出するステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記 K - r a s 変異が、G 1 2 S、G 1 2 V、G 1 2 D、G 1 2 A、G 1 2 C、G 1 3 A、G 1 3 D、および T 2 0 M から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に腫瘍が無反応であるかどうかを予測する方法であって、前記腫瘍のサンプルにおいて K - r a s 変異の有無を決定するステップを含み、前記 K - r a s 変異はコドン 1 2 またはコドン 1 3 またはコドン 2 0 にあり、かつ前記 K - r a s 変異の存在は、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に前記腫瘍が無反応であることを示唆する、方法。

【請求項 8】

30

前記腫瘍のサンプルにおいて K - r a s 変異の有無を決定する前記ステップが、前記腫瘍から K - r a s 核酸を増幅するステップと、前記増幅された核酸の配列を決定するステップとを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 E G F r ポリペプチド特異的結合剤が、E G F r に対する抗体である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 E G F r に対する抗体が、パニツムマブである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記腫瘍のサンプルにおいて K - r a s 変異の有無を決定する前記ステップが、変異 K - r a s ポリペプチド特異的結合剤を用いて変異 K - r a s ポリペプチドを検出するステップを含む、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記 K - r a s 変異が、G 1 2 S、G 1 2 V、G 1 2 D、G 1 2 A、G 1 2 C、G 1 3 A、G 1 3 D、および T 2 0 M から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本出願は、2007年3月13日出願の米国仮出願番号第60/906,943号の恩

50

典を主張するものであり、参照することにより、該出願はいかなる目的のためにも本明細書に援用される。

【0002】

本出願は、K - r a s 変異、変異 K - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および K - r a s 変異を同定する方法に関する。また本出願は、癌を診断する方法、ならびに腫瘍の治療における抗 E G F r 特異的結合剤の有用性を予測するための方法およびキットにも関連する。

【背景技術】

【0003】

背景

癌治療におけるモノクローナル抗体の特定の応用は、癌組織に免疫増強アイソタイプ、毒素または薬物等の細胞傷害性エフェクター機能の特異的に送達する抗体の能力に依存する。代替アプローチは、細胞受容体を介して成長因子によって媒介されるシグナル等の重要な細胞外増殖シグナルを取り除くことにより、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用いることである。このアプローチにおける魅力的な標的の1つは、E G F および形質転換成長因子 α (T G F α) に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を参照されたい)。E G F または T G F α が 170 k D a の膜貫通型細胞表面糖タンパク質である E G F r に結合すると、E G F r の自己リン酸化およびインターナリゼーションを含む細胞の生化学的事象のカスケードを誘発し、結果的に細胞が増殖する (例えば、U l l r i c h e t a l . , C e l l 61:203 - 212, 1990を参照されたい)。

【0004】

E G F r がヒト固形腫瘍の発生および進行の支持に関係していると思なす観察もいくつかある。E G F r は、多くの種類のヒト固形腫瘍に過剰発現されることが証明されている (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)を参照されたい)。例えば、E G F - r の過剰発現は、特定の肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、脳癌、膀胱癌、頭頸部癌、卵巣癌、および前立腺癌に観察されている (例えば、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)を参照されたい)。受容体レベルの増加が、不良な臨床予後と関連していると報告されている (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 . 64: 127 - 154, 1994、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 . 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、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 4:277 - 296, 1994、G u l l i c k , B r . M e d i c a l B u l l e t i n , 47:87 - 98, 1991、S a l o m o n e t a l . , C r i t . R e v . O n c o l . H e m a t o l . 19: 183 - 232, 1995を参照されたい)。上皮成長因子 (E G F) および形質転換成長因子 α (T G F - α) の両方が、E G F - r に結合して細胞増殖および腫瘍増殖をもたらすことが証明されている。多くの場合において、表面 E G F r の発現増加は腫瘍細胞による T G F α または E G F の産生を伴っており、それらの腫瘍の増殖にオートクリン増殖調節が関与しているを示唆している (例えば、B

10

20

30

40

50

aselga 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., Intl. J. of Oncology 4: 277 - 296, 1994、Salomon et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 19: 183 - 232, 1995を参照されたい)。

【0005】

したがって、あるグループは、EGF、TGF- α 、およびEGF-rに対する抗体が、EGF-rを発現または過剰発現する腫瘍の治療において有用である可能性を提案している(例えば、Mendelsohn Cancer Cells 7: 359 (1989), Mendelsohn Cancer Biology 1: 339 - 344 (1990), Modjtahedi and Dean Intl J. Oncology 4: 277 - 296 (1994), Tosi et al. Intl J. Cancer 62: 643 - 650 (1995)を参照されたい)。確かに、受容体に結合するEGFおよびTGF- α をブロックする抗EGF-r抗体が、腫瘍細胞増殖を阻害するらしいことが実証されている。しかしながら、それと同時に、抗EGF-r抗体は、EGFおよびTGF- α 単独の細胞増殖を阻害しないようであった(Modjtahedi and Dean Intl J. Oncology 4: 277 - 296 (1994))。

【0006】

腫瘍細胞に結合するEGFおよびTGF α を中和し、かつ生体外でのリガンド媒介性の細胞増殖を阻害する能力のあるヒトEGFrに特異的なモノクローナル抗体が、マウスおよ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 pp. 607 - 623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995、Fan et al., Curr. Opin. Oncol. 10: 67 - 73, 1998、Modjtahedi et al., Intl. J. Oncology 4: 277 - 296, 1994を参照されたい)。マウス108、225(例えば、Aboud-Pirak et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1605 - 1611, 1988を参照されたい)および528(例えば、Baselga et al., Pharmacol. Ther. 64: 127 - 154, 1994、Mendelsohn et al., in Biologic Therapy of Cancer pp. 607 - 623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995を参照されたい)、またはラットICR16、ICR62およびICR64(例えば、Modjtahedi et al., Intl. J. Oncology 4: 277 - 296, 1994、Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67: 247 - 253, 1993、Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67: 254 - 261, 1993を参照されたい)モノクローナル抗体等、これらの抗体のうちのいくつかは、異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖に影響を与える能力について大規模に評価された。ほとんどの抗EGFrモノクローナル抗体は、ヒト腫瘍細胞とともに投与した場合、胸腺欠損マウスにおいて腫瘍形成の予防に有効であった(Baselga et al. Pharmacol. Ther. 64: 127 - 154, 1994、Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67: 254 - 261, 1993)。確立したヒト腫瘍異種移植片を有するマウスにマウスモノクローナル抗体225および528を注射すると、部分的な腫瘍退縮を引き起こし、腫瘍の根絶のためにドキソルビシンまたはシスプラチン等の化学療法剤の併用投与を必要とした(Baselga e

t al. Pharmacol. Ther. 64: 127 - 154, 1994、Mendelsohn et al., in Biologic Therapy of Cancer pp. 607 - 623, Philadelphia: J. B. Lippincott Co., 1995、Fan et al., Cancer Res. 53: 4637 - 4642, 1993、Baselga et al., J. Natl. Cancer Inst. 85: 1327 - 1333, 1993)。マウス抗体の可変領域をヒト定常領域に結合した225モノクローナル抗体のキメラ型(C225)は、高用量でのみ、生体内抗腫瘍活性の向上を示した(例えば、Goldstein et al., Clinical Cancer Res. 1: 1311 - 1318, 1995、Prewett et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 419 - 427, 1996を参照されたい)。ラットのICR16、ICR62、およびICR64抗体は、確立した腫瘍の退縮を引き起こしたが、完全な根絶には至らなかった(Modjtahedi et al., Br. J. Cancer 67: 254 - 261, 1993)。これらの結果は、EGFrを発現する固形腫瘍の抗体療法のための有望な標的としてEGFrを確立し、複数のヒト固形腫瘍におけるC225モノクローナル抗体を用いたヒト臨床試験へと導くことになった(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., Intl. J. of Oncology 4: 277 - 296, 1994を参照されたい)。

【0007】

生物学的技術における特定の利点により、完全ヒト抗EGFr抗体を産生することが可能となった。ヒト免疫グロブリン遺伝子導入マウス(Xenomouse(商標) technology, Abgenix, Inc.)を用いて、ヒトEGFrに特異的なヒト抗体が開発された(例えば、Mendez, Nature Genetics, 15: 146 - 156, 1997、Jakobovits, Adv. Drug Deliv. Rev., 31(1-2): 33 - 42, 1998、Jakobovits, Expert Opin. Invest. Drugs, 7(4): 607 - 614, 1998、Yang et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 38(1): 17 - 23, 2001、国際公開第WO98/24893号、同第WO98/50433号を参照されたい)。そのような抗体の1つであるパニツムマブは、ヒトEGFrに対して 5×10^{-11} Mの親和性を有するヒトIgG2モノクローナル抗体であり、EGFのEGFrへの結合をブロックすること、受容体のシグナルをブロックすること、および生体外で腫瘍細胞の活性化および増殖を阻害することが判っている(例えば、国際公開第WO98/50433号、米国特許第6,235,883号を参照されたい)。胸腺欠損マウスにおける研究により、パニツムマブも生体内活性を有し、胸腺欠損マウスにおいてヒト類表皮癌A431異種移植片の形成を防ぐだけでなく、既に確立された大きな腫瘍A431異種移植片を根絶させることも実証している(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を参照されたい)。パニツムマブは、他の癌の中でも、腎癌、結腸直腸腺癌、前立腺癌、および非小細胞性扁平上皮肺癌の治療のために検討されてきており(例えば、米国特許公開第2004/0033543号を参照されたい)、その抗体を用いた臨床試験が進行中である。パニツムマブは、転移性結腸直腸癌を有する患者を治療するために食品医薬品局(Food & Drug Administration)から認可されている。

【0008】

E G F r の活性化は、少なくとも 2 つのシグナル経路を誘発する。特定の細胞型において、E G F r の活性化は、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ（「P I 3 K」）を刺激してアポトーシスを防ぐ。P I 3 K の活性化は、プログラム細胞死を制御する中枢経路の下方制御をもたらす分子カスケードを誘発する（Y a o , R . , S c i e n c e 2 6 7 : 2 0 0 3 - 2 0 0 6 , 1 9 9 5）。特定の細胞型において、E G F r の活性化は、R a s / R a f を介して M A P K カスケードを開始する。

【発明の概要】

【0009】

概要

特定の実施形態では、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に患者が無反応であるかどうかを予測する方法を提供する。特定の実施形態では、当該方法は、患者の腫瘍における K - r a s 変異の有無を決定するステップを含み、該 K - r a s 変異はコドン 1 2 またはコドン 1 3 またはコドン 2 0 にある。特定の実施形態では、K - r a s 変異が存在する場合は、患者は E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に無反応であることが予測される。

【0010】

特定の実施形態では、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に腫瘍が無反応であるかどうかを予測する方法を提供する。特定の実施形態では、当該方法は、上記腫瘍のサンプルにおける K - r a s 変異の有無を決定するステップを含み、該 K - r a s 変異はコドン 1 2 またはコドン 1 3 またはコドン 2 0 にある。特定の実施形態では、K - r a s 変異の存在は、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に腫瘍が無反応であることを示唆する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】野生型 K - r a s（配列番号 1 および 2）、G 1 2 S 変異 K - r a s（配列番号 3 および 4）、G 1 2 V 変異 K - r a s（配列番号 5 および 6）、G 1 2 D 変異 K - r a s（配列番号 7 および 8）、G 1 2 A 変異 K - r a s（配列番号 9 および 1 0）、G 1 2 C 変異 K - r a s（配列番号 1 1 および 1 2）、G 1 3 A 変異 K - r a s（配列番号 1 3 および 1 4）、G 1 3 D 変異 K - r a s（配列番号 1 5 および 1 6）、および T 2 0 M 変異 K - r a s（配列番号 1 7 および 1 8）の c D N A およびアミノ酸配列を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

特定の実施形態の詳細な説明

特許、特許出願、論文、教科書等を含む本明細書に列挙されるすべての参考文献、および本明細書に列挙される参考文献は、参照することにより、それらが既に実施されていない範囲でその全体が本明細書に組み込まれる。参照することにより組み込まれた 1 つもしくは複数の文書が、本出願における用語の定義と矛盾する用語を定義する場合には、本出願が優先される。本明細書で用いられる項目の見出しは、編成目的のためのものであって、記載される内容を限定すると解釈されるものではない。

【0013】

定義

別途定義されない限り、本発明と関連して用いられる科学用語および技術用語は、当該技術分野における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、文脈によって別途必要とされない限り、単数形の用語は複数を含み、複数形の用語は単数を含むものとする。

【0014】

一般的に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、タンパク質およびオリゴまたはポリヌクレオチド化学、ならびにハイブリダイゼーションと関連して用いられる、またはその技術において用いられる命名法は、当該技術分野において周知であり常

用されるものである。組み換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）には標準的な技術が用いられる。酵素反応および精製技術は、メーカーの仕様に従って、または当該技術分野において一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように実行される。前述の技術および手技は、通常、当該技術分野において周知である従来の方法に従って、また本明細書を通して引用かつ論じられる、様々な一般的な参考文献およびより具体的な参考文献に記載されるとおりに実行される。例えば、参照することにより本明細書に組み込まれる Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)) を参照されたい。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、ならびに薬用および医薬化学に関連して用いられる、またそれらの検査手技および技術に関連して用いられる命名法は、当該技術分野において周知であり常用されるものである。化学合成、化学分析、医薬の調製、処方、および送達、ならびに患者の治療には、一般的な技術が用いられる。

【0015】

本出願において、「または」の使用は、別途記載のない限り「および／または」を意味する。複数の従属請求項の文脈において、「または」の使用は、選択的にのみ、2項以上の前に記載される独立または従属請求項を指す。さらに、「含む (includes)」および「含まれた (included)」等の他の形態、および「含む (including)」という用語の使用は限定的ではない。また、「要素」または「構成要素」等の用語は、特に別途記載のない限り、1つのユニットを含む要素および構成要素、ならびに2つ以上のサブユニットを含む要素および構成要素の両方を包含する。

【0016】

本開示に従って用いられる場合、以下の用語は、別途指示のない限り、以下の意味を有すると理解されるものとする。

【0017】

「単離されたポリヌクレオチド」および「単離された核酸」という用語は同じ意味で用いられ、本明細書において用いられる場合は、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源のポリヌクレオチドまたはその組み合わせを意味するものとし、その起源に基づいて、(1) 「単離されたポリヌクレオチド」が天然に見出されるポリヌクレオチドの全部または一部分と関連していない、(2) 天然では結合していないポリヌクレオチドに作用可能に結合している、または (3) より大きな配列の一部として天然において存在しない。

【0018】

「単離されたタンパク質」および「単離されたポリペプチド」という用語は同じ意味で用いられ、本明細書において称される場合は、cDNA、組み換えRNA、もしくは合成起源のタンパク質、またはその組み合わせを意味するものとし、その起源または誘導源に基づいて、(1) 天然に見出されるタンパク質と関連していない、(2) 同じ源からの他のタンパク質を含まない（例えば、マウスタンパク質を含まない）、(3) 異なる種に由来する細胞によって発現される、または (4) 天然において存在しない。

【0019】

「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は同じ意味で用いられ、本明細書においては、未変性タンパク質、断片、ペプチド、またはポリペプチド配列の類似体を指す一般名称として用いられる。よって、未変性タンパク質、断片、および類似体は、ポリペプチド属の種である。

【0020】

ポリペプチド配列の変異についての文脈における「X#Y」という専門用語は当該技術分野で認識されており、「#」はポリペプチドのアミノ酸数という観点から変異の場所を示し、「X」は野生型アミノ酸配列において該位置に見出されるアミノ酸を示し、「Y」は該位置における変異アミノ酸を示す。例えば、K-ras ポリペプチドに関連して「G

1 2 S」という記号は、野生型 K - r a s 配列のアミノ酸数 1 2 にグリシンがあり、該グリシンは変異 K - r a s 配列においてセリンによって置き換えられていることを示す。

【0021】

「変異 K - r a s ポリペプチド」および「変異 K - r a s タンパク質」という用語は同じ意味で用いられ、G 1 2 S、G 1 2 V、G 1 2 D、G 1 2 A、G 1 2 C、G 1 3 A、G 1 3 D、および T 2 0 M から選択される少なくとも 1 つの K - r a s 変異を含む K - r a s ポリペプチドを指す。特定の例示的な変異 K - r a s ポリペプチドには、対立遺伝子変異体、スプライス変異体、誘導体変異体、置換変異体、欠失変異体、および／または挿入変異体、融合ポリペプチド、オーソログ、および種間相同体を含むが、これらに限定されない。特定の実施形態では、変異 K - r a s ポリペプチドは、リーダー配列残基、標的残基、アミノ末端のメチオニン残基、リジン残基、タグの残基および／または融合タンパク質の残基等の追加の残基を C 末端または N 末端で含むが、これらに限定されない。

10

【0022】

対象に適用して本明細書で用いられる「天然に存在する」という用語は、対象を天然に見出すことができるということを指す。例えば、天然源から単離することができ、かつ、人間によって実験室で意図的に変更されていないかまたは天然に存在する生命体（ウイルスを含む）中に存在する、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列である。

【0023】

本明細書において用いられる「作用可能に結合された」という用語は、構成要素を対象とする様式において、それらが機能することができるようにする関係になるような、構成要素の位置を指す。コード配列に「作用可能に結合された」制御配列は、制御配列に適合する条件下においてコード配列の発現が達成されるように連結する。

20

【0024】

本明細書において用いられる「制御配列」という用語は、それらが連結するコード配列の発現およびプロセッシングをもたらすために必要なポリヌクレオチド配列を指す。かかる制御配列の性質は宿主生物によって異なり、原核生物では、かかる制御配列は一般的にプロモーター、リボソーム結合部位、および転写終結配列を含み、真核生物では、かかる制御配列は一般的にプロモーターおよび転写終結配列を含む。「制御配列」という用語は、最低でも、その存在が発現およびプロセッシングのために必要不可欠であるすべての構成要素を含み、また、その存在が有利となる追加構成要素（例えば、リーダー配列および融合パートナー配列）をも含むことを意図する。

30

【0025】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたはどちらかの種類のヌクレオチドの修飾された形態のいずれかである、少なくとも 10 塩基の長さのヌクレオチドの重合体型を意味する。該用語は、1 本鎖および 2 本鎖形態の DNA を含む。

【0026】

「オリゴヌクレオチド」という用語は、本明細書において、天然に存在するおよび天然には存在しないオリゴヌクレオチドの結合によってともに結合された、天然に存在するおよび修飾されたヌクレオチドを含む。オリゴヌクレオチドは、一般的に 200 塩基以下の長さを有するポリヌクレオチドのサブセットである。好ましくは、オリゴヌクレオチドは 10～60 塩基の長さであり、最も好ましくは 12、13、14、15、16、17、18、19、または 20～40 塩基の長さである。オリゴヌクレオチドは、例えばプローブには、通常 1 本鎖であるが、例えば、遺伝子変異体の構築における使用には、オリゴヌクレオチドは 2 本鎖であり得る。本発明のオリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスのオリゴヌクレオチドのいずれかであり得る。

40

【0027】

「変異 K - r a s ポリヌクレオチド」、「変異 K - r a s オリゴヌクレオチド」、および「変異 K - r a s 核酸」という用語は同じ意味で用いられ、G 1 2 S、G 1 2 V、G 1 2 D、G 1 2 A、G 1 2 C、G 1 3 A、G 1 3 D、および T 2 0 M から選択される少なく

50

とも1つのK - r a s 変異を含むK - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指す。

【0028】

「天然に存在するヌクレオチド」という用語は、本明細書において、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含む。「修飾されたヌクレオチド」という用語は、本明細書において、修飾または置換された糖類等を有するヌクレオチドを含む。「オリゴヌクレオチド結合」という用語は、本明細書において、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート (phosphoroselenoate)、ホスホロジセレノエート (phosphorodiselenoate)、ホスホロアニロチオエート (phosphoroaniloathioate)、ホスホラニラデート (phosphoraniiladate)、ホスホロアミデート等のオリゴヌクレオチド結合を含む。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 Reviews 90:543 (1990) (参照することにより、その開示は本明細書に組み込まれる) を参照されたい。オリゴヌクレオチドは、必要に応じて、検出のための標識を含み得る。

【0029】

「選択的にハイブリダイズする」という用語は、本明細書において、検出可能かつ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、およびそれらの断片は、非特異的核酸への相当量の検出可能な結合を最小限に抑えるハイブリダイゼーションおよび洗浄条件下において、核酸鎖と選択的にハイブリダイズする。当該技術分野において既知であるように、また本明細書において論じられるように、選択的なハイブリダイゼーション条件を達成するために高ストリンジェンシー条件を用いることができる。一般的に、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、および断片と、対象となる核酸配列との間の核酸配列の相同性は少なくとも80%であり、またより典型的には、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、および100%と増加する相同性が好ましい。2つのアミノ酸配列は、それらの配列の間に部分的または完全な同一性が存在する場合に相同である。例えば、85%の相同性とは、2つの配列を最大の整合性となるよう整列させたときに、アミノ酸の85%が同一であることを意味する。整合性の最大化においてギャップ (整合する2つの配列のうちのいずれかにある) があってもよく、ギャップの長さは5以下であることが好ましく、2以下であることがより好ましい。あるいは好ましくは、2つのタンパク質配列 (または少なくとも30アミノ酸長のタンパク質配列に由来するポリペプチド配列) は、変異データマトリクスおよび6以上のギャップペナルティーを用いるプログラムALIGNを使用して、これらが (標準偏差単位において) 5を上回るアラインメントスコアを有する場合、本明細書においてこの用語が用いられるように、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)) および Supplement 2 to that volume, pp. 1-10を参照されたい。2つの配列またはその一部分は、ALIGNプログラムを使用して最適に整列させたときに、それらのアミノ酸が50%以上同一である場合に、相同性であることがより好ましい。「～に対応する」という用語は、本明細書において、あるポリヌクレオチド配列が参照ポリヌクレオチド配列の

全部もしくは一部分に相同である（すなわち、同一であり、厳密には進化論上は関連しない）こと、またはあるポリペプチド配列が参照ポリペプチド配列と同一であることを意味するために用いられる。反対に、用語「～に相補的である」は、相補的配列が参照ポリヌクレオチド配列の全部または一部分に相同であることを意味するために用いられる。例示として、ヌクレオチド配列「T A T A C」は参照配列「T A T A C」に対応し、そして参照配列「G T A T A」に相補的である。

【0030】

以下の用語は、2つ以上のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間の配列関係を説明するために用いられる。「参照配列」、「比較ウィンドウ」、「配列同一性」、「配列同一性の割合」、および「実質的な同一性」。「参照配列」とは、配列比較の基礎として用いられる確定された配列である。参照配列は、例えば、配列表に示される全長cDNAもしくは遺伝子配列のセグメントとしての長い配列のサブセットであっても、または完全なcDNAもしくは遺伝子配列を含んでもよい。一般的に、参照配列は少なくとも18ヌクレオチドまたは6アミノ酸の長さであるか、または少なくとも24ヌクレオチドまたは8アミノ酸の長さであるか、または少なくとも48ヌクレオチドまたは16アミノ酸の長さである。2個のポリヌクレオチドまたはアミノ酸はそれぞれ（1）2個の分子間で類似する配列（すなわち完全ポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の一部）を含み得るため、また（2）2個のポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列の間で相違した配列をさらに含み得るため、2個（またはそれ以上）の分子間の配列比較は、配列類似性の局所的な領域を同定して比較するために、典型的には2個の分子の配列を「比較ウィンドウ」と比較することにより行われる。本明細書で用いられる場合、「比較ウィンドウ」とは、少なくとも18個の連続するヌクレオチド位置または6アミノ酸の概念的なセグメントを指し、そこでは、ポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列は、少なくとも18個の連続するヌクレオチドまたは6アミノ酸配列の参照配列と比較され得、また、比較ウィンドウ内のポリヌクレオチド配列の一部が、2個の配列の最適な整列のために、（付加、欠失を含まない）参照配列と比較して、20%以下の付加、欠失、置換等（すなわちギャップ）を含み得る。比較ウィンドウを整列するための最適な配列の整列は、Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)の局所的相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970)の相同性整列アルゴリズム、Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 85:2444 (1988)の類似性検索法、これらのアルゴリズムのコンピュータによる実行(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.))、Geneworks、またはMacVectorソフトウェアパッケージ)、または検査によって行うことができ、様々な方法によって作り出される最良の整列（すなわち、比較ウィンドウにおいて最も高い相同性の割合となる）が選択される。

【0031】

「配列同一性」という用語は、比較ウィンドウに対して2個のポリヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が同一であること（すなわち、ヌクレオチドとヌクレオチドまたは残基と残基ごとに）を意味する。「配列同一性の割合」という用語は、比較ウィンドウに対して2個の最適に整列された配列を比較し、両方の配列において同一の核酸塩基（例えば、AまたはTまたはCまたはGまたはUまたはI）または残基が存在する位置の数を決定することにより一致する位置の数を得て、該一致する位置の数を比較ウィンドウ内の位置数（すなわちウィンドウの大きさ）の合計で除した結果に100を乗じることにより、配列同一性の割合が算出される。本明細書において用いられる場合「実質的な同一性」という用語は、ポリヌクレオチドまたはアミノ酸の配列の特徴を示し、少なくとも18ヌクレオチド（6アミノ酸）の位置にわたる比較ウィンドウで、しばしば少なくとも24～48ヌク

レオチド（８～１６アミノ酸）の位置にわたる比較ウィンドウで参照配列と比較したときに、該ポリヌクレオチドまたはアミノ酸の配列が、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、または９９％の配列同一性を有する配列を含み、その配列同一性の割合は、参照配列と、比較ウィンドウに対して参照配列の合計２０％以下の欠失または付加を含む可能性がある配列とを比較することによって算出される。該参照配列は、より長い配列のサブセットであり得る。

【００３２】

本明細書で用いられるように、２０個の通常のアミノ酸とそれらの略号は通常の使用法に従う。参照することにより本明細書に組み込まれる *Immunology – A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)) を参照されたい。「アミノ酸」または「アミノ酸残基」という用語は、本明細書において用いられる場合は、天然に存在する L - アミノ酸または D - アミノ酸を指す。常用されるアミノ酸の１文字および３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個の通常のアミノ酸の立体異性体（例えば、D - アミノ酸） α - 、 α - 二重置換アミノ酸等の非天然のアミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸および他の非通常アミノ酸もまた本発明のポリペプチドに適した構成要素となり得る。非通常のアミノ酸の例には以下を含む：４ - ヒドロキシプロリン、 γ - カルボキシグルタミン酸、 ϵ - N, N, N - トリメチルリシン、 ϵ - N - アセチルリシン、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 - ヒドロキシリシン、 σ - N - メチルアルギニン、および他の類似するアミノ酸およびイミノ酸（例えば、４ - ヒドロキシプロリン）。本明細書において用いられるポリペプチドの表記においては、標準的な使用法および慣習に従い、左手方向はアミノ末端方向であり、右手方向はカルボキシ末端方向である。

【００３３】

同様に、別途指定のない限り、１本鎖ポリヌクレオチド配列の左手端は５'末端、２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'方向への付加は、転写の方向と称される。RNA と同じ配列を有し、RNA 転写物の５'末端に対して５'側の 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'側の DNA 鎖上の配列領域は、「下流配列」と称される。

【００３４】

ポリペプチドに適用されたように、「実質的な同一性」という用語は、２個のペプチド配列が、デフォルトのギャップの重み付けを用いて G A P または B E S T F I T プログラム等によって最適に整列されたときに、少なくとも８０％の配列同一性を共有すること、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％または９６％または９７％または９８％の配列同一性、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、同一ではない残基の位置は、保存的なアミノ酸置換によって異なる。本明細書において論じられるように、アミノ酸配列における変動が少なくとも７５％、より好ましくは少なくとも８０％、９０％、９５％、最も好ましくは９９％で維持していると仮定すると、抗体または免疫グロブリン分子のアミノ酸配列における小さな変動は本発明に包含されることが企図される。保存的なアミノ酸置換は、それらの側鎖と関連しているアミノ酸のファミリー内で生じるものである。遺伝的にコードされるアミノ酸は、一般的に以下のファミリーに分割される。（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、および（４）非電荷極性＝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。より好ましいファミリーは以下のとおりである。セリンおよびスレオニンは脂肪族-水酸化ファミリー、アスパラギンおよびグルタミンはアミド含有ファミリー、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは脂肪族ファミリー、フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシンは芳香族ファミリー、ならびに、硫黄含有側鎖ファミリーとしてシステインおよびメチオニン。例えば、ロイシンをイソロイシンまたはバリンで、アスパラギン酸塩をグルタミン酸で、スレオニンをセリンで単独に置き換えること、またはアミノ酸を構造的に関連するアミノ酸で同様に置き換えることは、特にその置き換えが骨格となる部位の中にアミノ酸を含まない場合、結果として得られた分子の結合または特性に大きな影響を与えないと予期するのが妥当である。好ましい保存的なアミノ酸置換基は以下のとおりである：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、およびアスパラギン-グルタミン。

【0035】

好ましいアミノ酸置換は以下のとおりである。(1) タンパク分解に対する感受性を低下させる、(2) 酸化に対する感受性を低下させる、(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、(4) 結合親和性を変化させる、および(5) そのような類似体の他の物理化学的または機能的特性を与えるもしくは改変する。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の様々な突然変異タンパク質を含み得る。例えば、単一または複数のアミノ酸置換（好ましくは保存的なアミノ酸置換）は、天然に存在する配列において（好ましくは、分子間接触を形成するドメインの外側のポリペプチドの部分において）、行われる可能性がある。保存的なアミノ酸置換は、親配列の構造的性質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、親配列に生じるヘリックスを破壊しない、または親配列を特徴づける他の型の二次構造を乱さない傾向にあるべきである）。当技術分野において認識されるポリペプチドの二次および三次構造の例は、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))、およびThornton et al. Nature 354:105 (1991)に記載されており、参照することによって、それぞれが本明細書に組み込まれる。

【0036】

本明細書で用いられる「類似体」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を含むポリペプチドであって、該天然に存在するポリペプチドの活性のうちの少なくとも1つを有するポリペプチドを指す。通常、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に関して保存的なアミノ酸置換（または付加もしくは欠失）を含む。類似体は、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アミノ酸長またはそれ以上であり、しばしば、天然に存在する完全長のポリペプチドと同じ長さであり得る。

【0037】

ペプチド類似体は、医薬業界において、鋳型のペプチドと類似の特徴を有する非ペプチド薬として一般的に用いられる。これらの種類の非ペプチド化合物は「ペプチド模倣体 (peptide mimetics または peptidomimetics)」と呼ばれる。参照することにより本明細書に組み込まれるFauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986)、Veber and Freidinger TINS p. 392 (1985)、およびEvans et al. J. Med. Chem. 30:1229 (1987)を参照されたい。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によって開発される。治療上有用なペプチドに構造的に類似するペプチド模倣体は、同等な治療効果または予防効果をもた

らすために用いることができる。一般的に、ペプチド模倣体は構造的にヒト抗体等のパラダイムポリペプチド（すなわち、生化学的な特性または薬理学的な活性を有するポリペプチド）に類似しているが、当該技術分野において周知の方法により、 $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ （シスおよびトランス）、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 、および $-CH_2SO-$ から構成される群から選択される結合によって任意選択的に置き換えられる1個もしくは複数のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の1つもしくは複数のアミノ酸の、同じ型のD-アミノ酸での系統的置換（例えば、L-リジンの代わりにD-リジン）は、より安定したペプチドを作製するために用いることができる。さらに、コンセンサス配列または実質的に同一であるコンセンサス配列変異を含む制限ペプチドは、当該技術分野において既知の方法により作製することができ（参照することにより本明細書に組み込まれる *Rizo and Gierasch Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)）、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成する能力を持つ内部システイン残基を付加することにより、作製され得る。

10

【0038】

断片または類似体の好ましいアミノ末端およびカルボキシ末端は、機能性ドメインの境界近くに存在する。構造的および機能性ドメインは、ヌクレオチドおよび／またはアミノ酸配列のデータを、公共のまたは所有権を主張できる配列のデータベースと比較することにより同定され得る。好ましくは、コンピュータ化された比較方法が、既知の構造および／または機能の他のタンパク質に存在する配列モチーフまたは推定のタンパク質構造ドメインを同定するために用いられる。既知の三次元構造に折り畳むタンパク質配列を同定するための方法は既知である（*Bowie et al. Science* 253:164 (1991)）を参照されたい）。当業者は、本発明に従って、構造的および機能性ドメインを確定するために用いることができる配列モチーフおよび構造コンフォメーションを認識できる。

20

【0039】

「特異的結合剤」という用語は、標的に特異的に結合する天然または非天然の分子を指す。特異的結合剤の例としては、タンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物、脂質、および低分子化合物が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、特異的結合剤は抗体である。特定の実施形態では、特異的結合剤は抗原結合領域である。

30

【0040】

「EGFrポリペプチド特異的結合剤」という用語は、EGFrポリペプチドの任意の部分に特異的に結合する特異的な結合剤を指す。特定の実施形態では、EGFrポリペプチド特異的結合剤はEGFrポリペプチドに対する抗体である。特定の実施形態では、EGFrポリペプチド特異的結合剤は抗原結合領域である。特定の実施形態では、EGFrポリペプチド特異的結合剤はEGFrに対する抗体である。特定の実施形態では、EGFrポリペプチド特異的結合剤はパニツムマブである。

【0041】

「変異K-rasポリペプチド特異的結合剤」という用語は、変異K-rasポリペプチドの任意の部分に特異的に結合する特異的な結合剤を指す。特定の実施形態では、変異K-rasポリペプチド特異的結合剤は変異K-rasポリペプチドに対する抗体である。特定の実施形態では、変異K-rasポリペプチド特異的結合剤は抗原結合領域である。

40

【0042】

「特異的に結合する」という用語は、非標的に結合するよりも高い親和性を持って標的と結合する、特異的な結合剤の能力を指す。特定の実施形態では、特異的結合は、非標的に対する親和性よりも少なくとも10倍または50倍または100倍または250倍または500倍または1000倍高い親和性を持って標的と結合することを指す。特定の実施形態では、親和性は親和性ELISAアッセイによって決定される。特定の実施形態では、親和性はBIAcoreアッセイによって決定される。特定の実施形態では、親和性は

50

動力学的方法によって決定される。特定の実施形態では、親和性は平衡／溶液法によって決定される。特定の実施形態では、抗体とその認識された1つもしくは複数のエピトープとの間の解離定数が $\leq 1 \mu\text{M}$ 、好ましくは $\leq 100 \text{nM}$ 、また最も好ましくは $\leq 10 \text{nM}$ である場合に、抗体は抗原に特異的に結合すると言われている。

【0043】

特定の場合における「天然の抗体および免疫グロブリン」は、通常、2本の同一の軽(L)鎖および2本の同一の重(H)鎖からなる約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、一つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合されるが、ジスルフィド結合の数は免疫グロブリンの異なるアイソタイプの重鎖により変化する。各重鎖および軽鎖は、規則的に空間を隔てた鎖内のジスルフィド架橋も有する。各重鎖はその一端に可変ドメイン(VH)を有し、それに続いていくつかの定常ドメインを有する。各軽鎖は一方の端に可変ドメイン(VL)を有し、他方の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第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列する。特別のアミノ酸残基が、軽鎖および重鎖の可変ドメインの間の界面を形成していると考えられる(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))。

【0044】

「抗体」という用語は、インタクトな抗体および特異的結合においてインタクトな抗体と競合するその抗原結合断片の両方を指す。「その抗原結合断片」とは、インタクトな抗体分子の一部分または断片を指し、その断片は抗原結合機能を保持する。結合断片は、組み換えDNA技術によって、またはインタクトな抗体の酵素的もしくは化学的開裂(パパインを用いた開裂等)によって、生成される。結合断片はFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、1本鎖抗体(「scFv」)、Fd'およびFd断片を含む。モノクローナル抗体から様々な断片を生成するための方法が、当業者に周知である(例えば、Pluckhun, 1992, Immunol. Rev. 130:151-188を参照されたい)。「二重特異性」または「二機能性」抗体以外の抗体は、それぞれが同一の結合部位を有すると理解されている。抗体は、抗体の余剰により対抗受容体に結合した受容体の量が少なくとも約20%または40%または60%または80%、より一般的には約85%または90%または95%または96%または97%または98%または99%を上回って減少した場合(生体外の競合結合アッセイ法により測定)に、実質的に受容体が対抗受容体に接着するのを阻害する。

【0045】

「単離された」抗体は、その天然環境の構成要素から同定ならびに分離および／または回復された抗体である。天然の環境における汚染成分は、その抗体の診断的または治療的な使用を妨げる物質であり、それには酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を含み得る。好ましい実施形態では、抗体は、(1)Lowry法によって、およびスピニングカップシークエネーター(spinning cup sequenator)を用いた末端もしくは内部アミノ酸の配列決定によって決定される場合に、抗体の95重量%を上回るまで、または(2)クーマシーブルー染色、または好ましくは、銀染色を用いた還元条件下もしくは非還元条件下でSDS-PAGEによる均質性を示すまで、精製される。抗体の天然の環境の少なくとも1つの構成要素が存在しないため、単離された抗体は組み替え細胞内の原位置で抗体を含む。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製ステップによって調製される。

【0046】

「可変」という用語は、可変ドメインの特定の部分が配列において抗体間で大幅に異なることを指し、特定の抗原に対するそれぞれの特定の抗体の結合および特異性において用いられる。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインに均一に分布しているのではない

。それは、軽鎖および重鎖可変ドメインの両方にある「相補性決定領域」(CDR)または「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメントに集中している。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)と呼ばれる。天然の重鎖および軽鎖の可変ドメインはそれぞれ4つのFR領域を含み、これらは大抵βシート構成を採り、3つのCDRによって連結されているが、それらは該βシート構造を連結するループを形成し、またある場合には該βシート構造の一部を形成している。各鎖のCDRはFR領域によって極めて近接して保持され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabat et al., (1991)を参照されたい)。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与してはいないが、抗体の抗体依存性細胞障害性への参加等の様々なエフェクター機能を示す。

10

【0047】

「Fv」は、完全な抗原認識および抗原結合部位を含む最小の抗体断片である。2本鎖Fv種において、この領域は、密接に非共有結合した1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインの二量体から構成されている。一本鎖のFv種において、1つの重鎖可変ドメインおよび1つの軽鎖可変ドメインが可動性ペプチドリンカーによって共有結合されているため、軽鎖および重鎖は2本鎖のFv種の構造と類似する「二量体」構造で会合することができる。各可変ドメインの3つのCDRが相互作用してVH-VL二量体の表面上に抗原結合部位を確定するのはこの立体配置においてである。集合的に、6つのCDRが該抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、たとえ単一の可変ドメイン(または抗原に特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)であっても、完全な結合部位と比較すると低い親和性においてではあるが、抗原を認識および結合する能力を有する。

20

【0048】

本明細書において用いられる場合「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は一般的に「相補性決定領域」または「CDR」からのアミノ酸残基(例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基24-34(L1)、50-62(L2)、および89-97(L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の31-55(H1)、50-65(H2)および95-102(H3)、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))および/または、「超可変ループ」からの残基(例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基26-32(L1)、50-52(L2)および91-96(L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の26-32(H1)、53-55(H2)および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」または「FR」残基は、本明細書に定義される超可変領域以外のそれらの可変ドメイン残基である。

30

【0049】

「相補性決定領域」または「CDR」という用語は、本明細書において用いられる場合、特定のリガンドと接触してその特異性を決定する免疫受容体の一部分を指す。免疫受容体のCDRは、受容体タンパク質の最も可変性の部分であり、受容体に多様性を与え、受容体の可変ドメインの遠位端にある6つのループ上にあり、3つのループは受容体の2つの可変ドメインそれぞれに由来する。

40

【0050】

「抗体依存性の細胞媒介性細胞傷害性」および「ADCC」は、Fc受容体(FcRs)を発現する非特異的な細胞傷害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、およびマクロファージ)が標的細胞上に結合した抗体を認識し、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指す。ADCCを媒介する主要な細胞であるNK細胞がFcγRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞上におけるFcの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92

50

(1991)の464ページの表3にまとめられている。対象となる分子のADCC活性を評価するには、例えば、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載される生体外のADCCアッセイを行ってもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、抹消血単核細胞(PBMC)およびNK細胞が含まれる。代替的または付加的に、対象となる分子のADCC活性は、生体内で、例えば、Clynes et al., 1998, PNAS (USA), 95:652-656 (1988)に開示されるモデル等の動物モデルにおいて、評価することができる。

【0051】

「エピトープ」という用語は、免疫グロブリンおよび／またはT細胞受容体への特異的結合をする能力を持つ任意のタンパク質決定基を含む。エピトープ決定基は、通常はアミノ酸または糖側鎖等の分子の化学的に活性な表面群から構成され、また通常は特異的な三次元構造特性、および特異的な電荷特性を有する。

10

【0052】

「剤」という用語は、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的高分子、または生物学的物質から作製された抽出物を表すために本明細書で用いられる。

【0053】

本明細書で用いられる場合、「標識」または「標識された」という用語とは、例えば、放射標識されたアミノ酸の取り込み、または標識されたアビジン(例えば、光学的または比色定量的な方法によって検出され得る蛍光マーカまたは酵素活性を含有するストレプトアビジン)によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合等の、検出可能なマーカの取り込みを指す。特定の状況において、標識またはマーカは治療用であり得る。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法が当該技術分野において既知であり、用いられる。ポリペプチドの標識の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない。放射性同位体または放射性核種(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、および二次レポーターによって認識される予め決められた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、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)を含む。いくつかの実施形態では、潜在的な立体障害を低減させるために、様々な長さのスペーサーアームによって標識が結合される。

20

30

【0054】

本明細書で用いられる「医薬剤または薬物」という用語は、患者に適切に投与された場合、所望の治療効果を誘導する能力を持つ化学化合物または組成物を指す。本明細書における他の化学用語は、参照することにより本明細書に組み込まれるThe McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))に例示されるように、当該技術分野における慣例的使用法に従って用いられる。

【0055】

「抗悪性腫瘍剤」という用語は、ヒトにおいて腫瘍(具体的には細胞腫、肉腫、リンパ腫、の悪性(癌性)病変、または白血病等)の発生または進行を阻害する機能特性を有する剤を指して本明細書において用いられる。転移を阻害することは、しばしば抗悪性腫瘍剤の特性である。特定の実施形態では、抗悪性腫瘍剤はパニツムマブである。

40

【0056】

本明細書で用いられる場合、「実質的に純粋」とは、目的の種が存在する優勢な種である(すなわち、モル基準で、それが組成物中の他の個々のいずれの種よりも豊富である)ことを意味し、好ましくは実質的に精製された画分が組成物であり、存在するすべての高分子種の少なくとも約50パーセント(モル基準で)で、目的とする種が含まれる。一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物中に存在するすべての高分子種の約80以上を構

50

成し、より好ましくは８５％または９０％または９５％または９６％または９７％または９８％または９９％以上を構成する。最も好ましくは、目的の種が本質的に均質になるまで（従来の検出方法では汚染種が組成物中で検出できない）精製され、その組成物は本質的に単一の高分子種から構成される。

【００５７】

患者という用語は、ヒトおよび動物の対象を含む。

【００５８】

治療の目的のための「哺乳動物」および「動物」という用語は、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ等のヒト、家畜および農場の動物、ならびに動物園、競技、または愛玩動物を含む、哺乳動物に分類される任意の動物を指す。好ましくは、動物はヒトである。

10

【００５９】

「病態」という用語は、細胞もしくは身体の機能、システム、または器官の妨害、休止、または障害が発生した細胞または哺乳動物全体の生理的状态を指す。

【００６０】

「治療する」または「治療」という用語は、治療的処置および予防的または防止的処置の両方を指し、その目的は、癌の発症または転移等、望ましくない生理学的変化または障害を防止するかまたは抑制する（軽減する）ことである。本発明の目的のために、有益または所望の臨床成績としては、検出可能であるか検出不能であるかにかかわらず、症状の軽減、疾病の程度の低減、安定した（すなわち悪化していない）病態、疾病進行の遅延または抑制、病態の改善または緩和、および寛解（部分的または全体的のいずれか）が挙げられるが、これらに限定されない。「治療」とは、治療を受けなかった場合に予測される生存期間と比較して生存期間を延長することも意味し得る。治療を必要とする者には、既にその状態または疾患を有する者およびその状態または疾患に罹患し易い者、またはその状態または疾患が防止されるべき者を含む。

20

【００６１】

本明細書で用いられる場合「反応する」という用語は、RECIST（Response Evaluation Criteria in Solid Tumors、固形癌治療効果判定基準）によると、薬剤投与後に患者または腫瘍が完全奏功または部分奏功を示すことを意味する。本明細書で用いられる場合「無反応」という用語は、RECISTによると、薬剤投与後に患者または腫瘍が安定または進行を示すことを意味する。RECISTは、例えばTherasse et al., February 2000, “New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors,” J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216に記載されており、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。例示的な薬剤としては、EGFRに対する抗体を含む、EGFRポリペプチド特異的結合剤が挙げられるが、これに限定されない。

30

【００６２】

「疾患」とは、１つもしくは複数の治療が有益な任意の状態である。これには、哺乳動物を該当する疾患にかかりやすくする病理学的状態を含む、慢性および急性疾患または疾病が含まれる。本明細書において治療されるべき疾患の非制限例には、良性および悪性腫瘍、白血病、およびリンパ性悪性疾患、具体的には乳癌、直腸癌、卵巣癌、胃癌、子宮内膜癌、唾液腺癌、腎癌、大腸癌、甲状腺癌、膀胱癌、前立腺または膀胱癌を含む。本発明に従って治療されるべき好ましい疾患は、子宮頸癌および子宮頸部の扁平上皮内腫瘍および腺腫瘍、腎細胞癌（RCC）、食道腫瘍、ならびに癌由来細胞株等の悪性腫瘍である。

40

【００６３】

「EGFRポリペプチドに関連する疾病または状態」は、以下のうちの１つもしくは複数を含む。EGFRポリペプチドによって引き起こされる疾病または状態、EGFRポリペプチドに起因する疾病または状態、およびEGFRポリペプチドの存在に関連する疾病または状態。特定の実施形態では、EGFRポリペプチドに関連する疾病または状態は癌

50

である。例示的な癌としては、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、能癌、膀胱癌、頭頸部癌、卵巣癌、および前立腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。

【0064】

「変異K - r a s ポリペプチドに関連する疾病または状態」は以下のうちの1つもしくは複数を含む：変異K - r a s ポリペプチドによって引き起こされる疾病または状態、変異K - r a s ポリペプチドに起因する疾病または状態、変異K - r a s ポリペプチドを引き起こす疾病または状態、および変異K - r a s ポリペプチドの存在に関連する疾病または状態。特定の実施形態では、変異K - r a s ポリペプチドに関連する疾病または状態は、変異K - r a s ポリペプチドの不在下において存在し得る。特定の実施形態では、変異K - r a s ポリペプチドに関連する疾病または状態は、変異K - r a s ポリペプチドの存在によって悪化し得る。特定の実施形態では、変異K - r a s ポリペプチドに関連する疾病または状態は、癌である。例示的な癌としては、非小細胞肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌、能癌、膀胱癌、頭頸部癌、卵巣癌、および前立腺癌が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0065】

「併用療法」において、患者は、化学療法剤ならびに抗悪性腫瘍剤および／または放射線療法と併用した、標的抗原に対する特異的結合剤を用いて治療される。特定の実施形態では、特異的結合剤はパニツムマブである。プロトコル設計は、腫瘍量の減少および標準的な化学療法の通常用量を減少させる能力によって評価される有効性を検討する。これらの用量の減少により、化学療法剤の用量関連毒性を減少させることによってさらなるお

20

【0066】

「単剤療法」とは、化学療法剤または抗悪性腫瘍剤を併用せずに、患者に免疫療法を施行することによって疾患を治療することを指す。特定の実施形態では、単剤療法は、化学療法剤ならびに抗悪性腫瘍剤および／または放射線療法の不在下において、パニツムマブを投与することを含む。

【0067】

特定の実施形態

特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断する方法を提供する。

30

【0068】

特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて変異K - r a s ポリペプチドの存在または発現の量を決定するステップと、(b) そのポリペプチドの存在または発現の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて変異K - r a s ポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量を決定するステップと、(b) そのポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、該疾病または状態は、癌である。

40

【0069】

特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断する方法は、(a) 配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、および配列番号18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存在または発現の量を決定するステップと、(b) そのポリペプチドの存在または発現の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて、配列番号4、配列番号6、配列番号8

50

、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、および配列番号18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存在または転写もしくは翻訳の量を決定するステップと、(b) そのポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、該疾病または状態は、癌である。

【0070】

特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断する方法を提供する。特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて変異K - r a s ポリペプチドの存在または発現の量を決定するステップと、(b) そのポリペプチドの存在または発現の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて変異K - r a s ポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量を決定するステップと、(b) そのポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、該疾病または状態は、癌である。

【0071】

特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、および配列番号18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存在または発現の量を決定するステップと、(b) そのポリペプチドの存在または発現の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、対象において1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断する方法は、(a) 対象由来のサンプルにおいて、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、および配列番号18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存在または転写もしくは翻訳の量を決定するステップと、(b) そのポリヌクレオチドの存在または転写もしくは翻訳の量に基づいて、1つもしくは複数のK - r a s 変異に関連する疾病または状態に対する感受性を診断するステップとを含む。特定の実施形態では、該疾病または状態は、癌である。

【0072】

特定の実施形態では、変異K - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有無を決定する方法を提供する。特定の実施形態では、サンプル中において変異K - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有無を決定する方法は、(a) 変異K - r a s ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするプローブにサンプルを曝露するステップであって、該領域はG12S、G12V、G12D、G12A、G12C、G13A、G13D、およびT20Mから選択される少なくとも1つのK - r a s 変異を含むステップと、(b) 該サンプル中において変異K - r a s ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの有無を決定するステップとを含む。特定の実施形態では、サンプル中において変異K - r a s ポリペプチドの有無を決定する方法は、(a) 変異K - r a s ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするプローブにサンプルを曝露するステップであって、該領域はG12S、G12V、G12D、G12A、G12C、G13A、G13D、およびT20Mから選択される少なくとも1つのK - r a s 変異を含むステップと、(b) 該サンプル中において変異K - r a s ポリペプチドの有無を決定するステップとを含む。

【0073】

特定の実施形態では、(a)ある集団における個体の遺伝子プロファイルにおいて、少なくとも1つのK - r a s 変異の存在を決定するステップと、(b)変異K - r a s 遺伝子プロファイルとその個体との間の関係を確立するステップとを含む、個体の特異的な集団において変異K - r a s 集団のプロファイルを確立するための方法を提供する。そのような特定の実施形態では、個体の特異的な特徴はK - r a s 変異に関連する疾病または状態を発症する感受性を含む。そのような特定の実施形態では、個体の特異的な特徴はK - r a s 変異に関連する疾病または状態を呈することを含む。

【0074】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G12Sの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

10

【0075】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G12Vの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

20

【0076】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G12Dの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

【0077】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G12Aの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

30

【0078】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G12Cの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

【0079】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G13Aの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

40

【0080】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異G13Dの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてEGFRポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、EGFRポリペプチド特異的結合剤は、EGFRに対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

50

【0081】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s 変異T 1 2 Mの有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてE G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、E G F r ポリペプチド特異的結合剤は、E G F r に対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

【0082】

特定の実施形態では、対象においてK - r a s のアミノ酸1 2および／またはK - r a s のアミノ酸1 3および／またはアミノ酸2 0でK - r a s 変異の有無を決定するステップを含む、癌に罹患している対象においてE G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性を予測する方法を提供する。特定の実施形態では、E G F r ポリペプチド特異的結合剤は、E G F r に対する抗体である。そのような特定の実施形態では、該抗体はパニツムマブである。

10

【0083】

特定の実施形態では、対象において変異K - r a s 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を提供する。そのような特定の実施形態では、該キットは変異K - r a s ポリペプチドの領域をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするプローブを含み、該領域はG 1 2 S、G 1 2 V、G 1 2 D、G 1 2 A、G 1 2 C、G 1 3 A、G 1 3 D、およびT 2 0 Mから選択される少なくとも1つのK - r a s 変異を含む。特定の実施形態では、該キットは2つ以上の増幅プライマーをさらに含む。特定の実施形態では、該キットは検出コンポーネントをさらに含む。特定の実施形態では、該キットは核酸サンプリングコンポーネントをさらに含む。

20

【0084】

特定の実施形態では、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に対する無反応性は、R E C I S T（固形癌治療効果判定基準）を用いて決定される。R E C I S Tによる完全奏功または部分奏功は、両方ともE G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に反応すると見なされる。安定および進行の両方ともが、E G F r ポリペプチド特異的結合剤を用いる治療に無反応であると思なされる。R E C I S Tは当該技術分野において既知であり、例えば、参照することによりいずれの目的のためにも本明細書に組み込まれるTherasse et al., February 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92(3): 205-216を参照されたい。

30

【0085】

特定の実施形態では、K - r a s 変異が検出される。特定の実施形態では、変異K - r a s ポリヌクレオチドを検出することにより、K - r a s 変異が検出される。特定の実施形態では、変異K - r a s ポリペプチドを検出することにより、K - r a s 変異が検出される。

【0086】

ポリヌクレオチドにおける変異を検出する特定の方法は、当該技術分野において既知である。そのような方法の特定の例としては、配列決定法、プライマー伸長反応法、電気泳動法、picogreenアッセイ、オリゴヌクレオチドライゲーションアッセイ、ハイブリダイゼーションアッセイ、TaqManアッセイ、SNPlexアッセイ、および、例えば、米国特許第5,470,705号、5,514,543号、5,580,732号、5,624,800号、5,807,682号、6,759,202号、6,756,204号、6,734,296号、6,395,486号、および米国特許出願第US 2003-0190646 A1号に記載されるアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0087】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドにおいて変異を検出するステップは、最初に変

50

異を含む可能性があるポリヌクレオチドを増幅するステップを含む。ポリヌクレオチドを増幅するための特定の方法は、当該技術分野において既知である。そのような増幅産物は、ポリヌクレオチドにおいて変異を検出するために、本明細書に記載される方法または当該技術分野において既知である方法のうちのいずれにおいても用いることができる。

【0088】

ポリペプチドにおいて変異を検出する特定の方法は、当該技術分野において既知である。そのような方法の特定の例には、変異ポリペプチドに特異的な特異的結合剤を用いる検出を含むが、これに限定されない。変異ポリペプチドを検出する他の方法は、電気泳動法およびペプチド配列決定法を含むが、これに限定されない。

【0089】

ポリヌクレオチドおよび／またはポリペプチドにおいて変異を検出する特定の例示的方法是、例えば、Schimanski et al. (1999) Cancer Res., 59: 5169-5175、Nagasaki et al. (2004) J. Clin. Oncol., 22: 4584-4596、PCT公開第WO 2007/001868 A1号、米国特許公開第2005/0272083 A1号、およびLievre et al. (2006) Cancer Res. 66: 3992-3994に説明されている。

【0090】

特定の実施形態では、1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイを提供する。特定の実施形態では、1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドをコードする1つもしくは複数のポリヌクレオチドに相補的な1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含むマイクロアレイを提供する。

【0091】

特定の実施形態では、マイクロアレイ技術を用いて、2つ以上の細胞または組織サンプルにおける1つもしくは複数の変異K-rasポリヌクレオチドの有無が評価される。特定の実施形態では、マイクロアレイ技術を用いて、2つ以上の細胞または組織サンプルにおける1つもしくは複数の変異K-rasポリヌクレオチドの量が評価される。

【0092】

特定の実施形態では、マイクロアレイ技術を用いて、2つ以上の細胞または組織サンプルにおける1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドの有無が、評価される。そのような特定の実施形態では、最初にmRNAが細胞または組織サンプルから抽出され、続いてcDNAに変換されて、マイクロアレイとハイブリダイズされる。そのような特定の実施形態では、マイクロアレイに特異的に結合するcDNAの有無が変異K-rasポリペプチドの有無を示す。そのような特定の実施形態では、1つもしくは複数の変異K-ras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するcDNAの量を定量化することにより評価される。

【0093】

特定の実施形態では、1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドに特異的な1つもしくは複数の結合剤を含むマイクロアレイを提供する。そのような特定の実施形態では、細胞または組織における1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドの有無が評価される。そのような特定の実施形態では、細胞または組織における1つもしくは複数の変異K-rasポリペプチドの量が評価される。

【0094】

実施された実験および達成された結果を含む以下の実施例は、例示目的のためのみに提供されるのであって、特許請求の範囲を限定すると解釈されるべきではない。

【0095】

実施例

実施例1

結腸直腸腺癌サンプルにおけるK-RASエクソン2の変異の検出

10

20

30

40

50

結腸直腸腺癌（「CRC」）と関連するK - r a sエクソン2における変異を同定するために、CRC患者37人の腫瘍からK - r a sエクソン2を増幅した。パニツムマブを用いて患者を治療する前に、CRC試験に登録された37人の患者由来の二重盲検腫瘍サンプルを得た。本試験は、多施設、非盲検、単群臨床試験であった。毎週2.5mg/kgのパニツムマブを用いて患者を治療し、進行が認められるまで8週間サイクルで繰り返した。RECIST基準を用いて、放射線学的な（少なくとも2人の）中央審査により盲検下で腫瘍の評価を行い、最初に反応基準が満たされてから4週間以上後に確認した。単離された各エクソンを配列決定し、それらのエクソンの野生型配列からのいずれの変化も同定した。

【0096】

37人の患者からCRCサンプルを収集した。各腫瘍サンプルの一部を染色してその腫瘍のEGFr発現量を同定し、染色を3段階で評価した（染色の程度が最も強いのが「3」）。各腫瘍サンプルの少なくとも10%が、染色レベル3を示した。腫瘍組織を、ホルマリンで固定してパラフィン包埋した組織切片を巨視的に切開して、隣接する正常組織、壊死片、および間質から分離した。切り取ったサンプルを顕微鏡スライドに固定して、室温で保存した。

【0097】

（表1）CRC患者サンプル

組織構造番号	患者番号	臨床試験患者番号
05H-5699EB	17040	5149
04H-405CSB	17043	5152
04H-406DB	17046	5139
05H-5700NM	17049	5150
05H-5698RBR	17052	5147
05H-5692SM	17055	5093
05H-5783JMY	17061	5143
04H-413EED	17066	5151
05H-5694CS	17069	5141
05H-5689RBA	17075	5072
05H-5697IAM	17078	5145
04H-746XC	18215	5101
04H-747SH	18230	5133
04H-748JA	18244	5097
04H-750GR	18275	5115
04H-752HBM	18321	5105
04H-753JR	18333	5106
04H-754BLB	18347	5113
04H-755JE	18361	5110
04H-758GDM	18396	5120
04H-759JH	18410	5123
04H-760OGM	18422	5124
04H-762GRK	18449	5131
04H-763CHK	18463	5129
04H-765DB	18491	5136
04H-766LA	18505	5137
04H-768LGL	18526	5119
04H-771WRH	18554	5102
04H-772CEM	18569	5125
04H-773LOO	18583	5096
04H-775BM	18614	5107
04H-776LAP	18628	5108
04H-780GL	18688	5135
04H-781JLK	18702	5121
05H-5686FEC	23458	5030
05H-5690JFF	23481	5079
05H-5696REF	23534	5144

10

20

30

【0098】

製造者のプロトコルに従ってPinpoint Slide DNA Isolation System (Zymo Research, Orange, CA) を使用して、サンプルスライドからゲノムDNAを調製した。単離されたゲノムDNAの最終産物を500 µLの水に溶解した。

40

【0099】

野生型K-rasポリペプチド配列を図1Aに示す(配列番号2、GenBank受入(Accession)番号NP_004976)。また野生型K-ras cDNA配列も図1Aに示す(配列番号1、Genbank受入番号NM_004985)。ゲノムの野生型K-rasヌクレオチド配列は、Genbank受入番号NM_004985に見られる。各エクソンのプライマー配列は、野生型K-rasのcDNA配列(配列番号1)内におけるエクソン2に対するイントロン配列5'および3'を用いて設計した。ヒトK-rasのエクソン2に対応する配列は、特異的プライマーであるプライマー3401-41(5'-AAGGTACTGGTGGAGTATTTG-3'、配列番号19)

50

およびプライマー 3401 - 44 (5' - GTACTCATGAAAAATGGTCAGAG - 3'、配列番号 20) を用いて PCR により増幅した。

【0100】

Taq DNA ポリメラーゼ (Roche Diagnostics Corp) またはその同等物、および以下の条件を用いて PCR を行った: 5 μ L の 10 $\times$ Taq 緩衝液、0.5 μ L の 24mM MgCl₂、1 μ L のゲノム DNA (約 0.5 ng)、7 μ L の 2.5mM dNTPs、および合わせて混合した 1 μ L の Taq ポリメラーゼ (5 U) と 29.5 μ L の ddH₂O。合わせたプライマー原液 6 μ L (それぞれ 10 μ M) を各試験管に加えた。サイクルプロトコルは、93 $^{\circ}$ C で 4 分の 1 サイクル; 93 $^{\circ}$ C で 10 秒、62 $^{\circ}$ C で 30 秒、72 $^{\circ}$ C で 30 秒を 35 サイクル; および 72 $^{\circ}$ C で 4 分の 1 サイクルであった。反応の最後には、温度を 4 $^{\circ}$ C で維持した。

10

【0101】

それぞれ別個のエクソンの PCR 産物をゲルで精製した。TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen Corp) をメーカーの指示に従って用い、精製した増幅エクソン配列を pCR2.1 ベクターにサブクローン化した。Genetic Colony Picker を用いて、該ベクターおよび対象となる挿入エクソン (insert exon) を含む大腸菌コロニーを選択した。これらのコロニーを液体培地中で一晚増殖させた。QIAGEN 9600 または 3000 または 8000 Bio-robot (Qiagen) をメーカーの指示に従って用い、一晚経った各細菌培養からのプラスミド DNA を単離した。

20

【0102】

BigDye 3.1 Terminator Kit (Applied Biosystems, Inc.) をメーカーの指示に従って用い、各エクソンを含む単離されたプラスミド DNA の配列決定を行った。3700 または 3100 または 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.) を用いて配列決定データを収集し、Sequencher プログラム (GeneCodes Corp.) を用いて分析した。該患者のサンプル由来のエクソン配列を野生型エクソン配列と比較した。

【0103】

CRC 患者の腫瘍サンプルの変異分析により、13 人の患者が K-ras のエクソン 2 の変異を有すると同定された (表 2)。CT または MRI を用いて腫瘍反応を評価し、腫瘍の大きさに基づいて、完全奏功、部分奏功、安定、または進行を同定するためのガイドラインを提供する RECIST (固形癌治療効果判定基準) を用いて統計学的に分析した (例えば、Therasse et al., February 2000, "New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors," J. Natl. Cancer Inst. 92 (3): 205 - 216 を参照されたい)。

30

【0104】

(表 2) CRC 患者サンプルの結果

患者腫瘍 サンプルID	変異	反応
5149	WT	PD
5152	G12S	PD
5139	G12V	PD
5150	WT	PD
5147	WT	PD
5093	G12D	SD
5143	G13D	PD
5151	WT	PD
5141	G12V	PD
5072	WT	PD
5145	WT	SD
5101	WT	SD
5133	WT	SD
5097	WT	PR
5115	G12A	SD
5105	WT	PR
5106	G12D	PD
5113	G12C	PD
5110	WT	SD
5120	WT	PR
5123	WT	SD
5124	WT	PD
5131	WT	PD
5129	WT	SD
5136	WT	PD
5137	G12V	PD
5119	WT	SD
5102	G12V	PD
5125	G12V, T20M	SD
5096	WT	SD
5107	G12D	PD
5108	WT	PD
5135	WT	SD
5121	WT	SD
5030	WT	PR
5079	WT	SD
5144	G12D	PD

10

20

30

【0105】

PDは進行を表し、PRは部分奏功を表し、SDは安定を表す。

【0106】

37個の腫瘍のうち、13個がK-rasのエクソン2に変異を有し(36%)、24個がK-rasのエクソン2における野生型であった(64%)。K-rasのエクソン2に変異を有した13個の腫瘍のうち、パニツムマブに部分奏功を示したものは認められなかった(0%)。反対に、K-rasの野生型エクソン2を有する腫瘍のうちの4個(17%)が、パニツムマブに部分奏功を示した。同様に、エクソン2に変異を有する腫瘍のうちわずか3個(23%)がパニツムマブ治療の後に安定を示し、一方、K-rasの野生型エクソン2を有する腫瘍のうち11個(46%)が安定を示した。最後に、エクソン2に変異を有する腫瘍のうち10個(77%)がパニツムマブ治療後に進行を示した一方、K-rasの野生型エクソン2を有する腫瘍のわずか9個(37%)が進行を示した。

40

【0107】

それらのデータを表3にまとめる。

50

【0108】

(表3)CRC患者の変異の状態およびパニツムマブに対する反応のまとめ

	変異+	変異-
PR	0 (0%)	4 (17%)
SD	3 (23%)	11 (46%)
PD	10 (77%)	9 (37%)

【0109】

10

この分析において、K-rasエクソン2における変異、特に変異G12S、G12V、G12D、G12A、G12C、G13A、G13D、およびT20Mは、パニツムマブ治療に対する無反応性と相関性があった。

【0110】

本明細書に開示される詳細および本発明の実践を考慮すると、当業者には他の実施形態が明白になる。本明細書および実施例は例示目的のみであると見なされることを意図する。

【図1A】

(配列番号1) 野生型 K-ras cDNA

```
ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
ACCATTTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAATATA 350
ATGTGATTTC CTCTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAAGACG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAACATAA AGAAAGAGTG AGCAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGCAA AGTGTTGTAAT 560
TATGTAA 567
```

(配列番号2) 野生型 K-ras アミノ酸配列

```
MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEFLC VFAINNTKSF EDIHNYREQI 100
KRKVDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188
```

【図1B】

(配列番号3) K-ras (G12S) cDNA

```
ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTAGTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
ACCATTTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAATATA 350
ATGTGATTTC CTCTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAAGACG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAACATAA AGAAAGAGTG AGCAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGCAA AGTGTTGTAAT 560
TATGTAA 567
```

(配列番号4) K-ras (G12S) アミノ酸配列

```
MTEYKLVVVG ASGVGKSALT IQLIQNHFD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEFLC VFAINNTKSF EDIHNYREQI 100
KRKVDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188
```

【図1C】

(配列番号5) K-ras (G12V) cDNA

```
ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGTTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
ACCATTTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAATATA 350
ATGTGATTTC CTCTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAAGACG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAACATAA AGAAAGAGTG AGCAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGCAA AGTGTTGTAAT 560
TATGTAA 567
```

(配列番号6) K-ras (G12V) アミノ酸配列

```
MTEYKLVVVG AVGVGKSALT IQLIQNHFD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEFLC VFAINNTKSF EDIHNYREQI 100
KRKVDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188
```

【図1D】

(配列番号7) K-ras (G12D) cDNA

```
ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGATGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTTTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTTCTTTGT GTATTGGCCA TAAATAATAC TAAATCATTT GAAGATATTC 280
ACCATTTATAG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGGTCCCTAG TAGGAATATA 350
ATGTGATTTC CTCTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAAGACG GGTGTTGATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAACATAA AGAAAGAGTG AGCAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGCAA AGTGTTGTAAT 560
TATGTAA 567
```

(配列番号8) K-ras (G12D) アミノ酸配列

```
MTEYKLVVVG ADGVGKSALT IQLIQNHFD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRGTGEFLC VFAINNTKSF EDIHNYREQI 100
KRKVDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188
```

【図 1 E】

(配列番号9) K-ras (G12A) cDNA

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGCTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTCTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTCCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
ACCATATATG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGCTCCTAG TAGGAAATTA 350
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTGTATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAAAATATA AGAAAAGATG AGCAAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
TATGTAA 567

【図 1 G】

(配列番号13) K-ras (G13A) cDNA

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGCCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTCTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTCCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
ACCATATATG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGCTCCTAG TAGGAAATTA 350
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA CACAAGACAG GGTGTGTATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAAAATATA AGAAAAGATG AGCAAAAGATG AGCAAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
TATGTAA 567

(配列番号10) K-ras (G12A) アミノ酸配列

MTEYKLVVVG AAGVGKSALT IQLIQNHFDV EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
KRKVKSESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

(配列番号14) K-ras (G13A) アミノ酸配列

MTEYKLVVVG AGAVGKSALT IQLIQNHFDV EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
KRKVKSESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

【図 1 F】

(配列番号11) K-ras (G12C) cDNA

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGCTGGCG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTCTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTCCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
ACCATATATG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGCTCCTAG TAGGAAATTA 350
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTGTATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAAAATATA AGAAAAGATG AGCAAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
TATGTAA 567

【図 1 H】

(配列番号15) K-ras (G13D) cDNA

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGACG TAGGCAAGAG TGCCTTGACG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTCTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTCCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
ACCATATATG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGCTCCTAG TAGGAAATTA 350
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTGTATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAAAATATA AGAAAAGATG AGCAAAAGATG AGCAAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
TATGTAA 567

(配列番号12) K-ras (G12C) アミノ酸配列

MTEYKLVVVG ACGVGKSALT IQLIQNHFDV EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
KRKVKSESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

(配列番号16) K-ras (G13D) アミノ酸配列

MTEYKLVVVG AGDVGKSALT IQLIQNHFDV EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
KRKVKSESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

【図 1 I】

(配列番号17) K-ras (T20M) cDNA

ATGACTGAAT ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTGGTGCCG TAGGCAAGAG TGCCTTGATG ATACAGCTAA 70
TTCAGAAATCA TTTTGTGGAC GAATATGATC CAACAATAGA GGATTCCTAC AGGAAGCAAG TAGTAATTGA 140
TGGAGAAACC TGCTCTCTGG ATATTCTCGA CACAGCAGGT CAAGAGGAGT ACAGTGCAAT GAGGGACCAG 210
TACATGAGGA CTGGGGAGGG CTTCCTTTGT GTATTTGCCA TAAATAATAC TAAATCATT GAAGATATTC 280
ACCATATATG AGAACAAATT AAAAGAGTTA AGGACTCTGA AGATGTACCT ATGCTCCTAG TAGGAAATTA 350
ATGTGATTTG CCTTCTAGAA CAGTAGACAC AAAACAGGCT CAGGACTTAG CAAGAAGTTA TGGAAATTCCT 420
TTTATTGAAA CATCAGCAAA GACAAGACAG GGTGTGTATG ATGCCTTCTA TACATTAGTT CGAGAAATTC 490
GAAAAATATA AGAAAAGATG AGCAAAAGATG GTAAAAAGAA GAAAAAGAAG TCAAAAGACAA AGTGTGTAAT 560
TATGTAA 567

(配列番号18) K-ras (T20M) アミノ酸配列

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFDV EYDPTIEDSY RKQVVIDGET 50
CLLDILDLAG QEEYSAMRDQ YMRITGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREQI 100
KRKVKSESDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ 150
GVDDAFYTLV REIRKHKEKM SKDGKKKKKK SKTKCVIM 188

【配列表】

2010521153000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/003312

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. 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)
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, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EBERHARD D A ET AL: "Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 23, no. 25, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 5900-5909, XP002400936 ISSN: 0732-183X the whole document tables 2,4. ----- -/-	1,2,6-8, 12

☒ 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
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 August 2008

Date of mailing of the international search report

30/09/2008

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. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Quirin, Katharina

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/003312

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAO W ET AL: "KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib" PLOS MEDICINE 2005 US, vol. 2, no. 1, 2005, pages 0057-0061, XP002400935 ISSN: 1549-1277 1549-1676 the whole document tables 1,2	1,2,6-8, 12
X	LIÈVRE ASTRID ET AL: "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." CANCER RESEARCH 15 APR 2006, vol. 66, no. 8, 15 April 2006 (2006-04-15), pages 3992-3995, XP002400937 ISSN: 0008-5472 the whole document table 1	1-3,6-9, 12
X	WO 2007/001868 A (GENENTECH INC [US]; HILLAN KENNETH J [US]) 4 January 2007 (2007-01-04) the whole document	1-12
P,X	BENVENUTI SILVIA ET AL: "Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies" 20070315, 15 March 2007 (2007-03-15), XP002491315 the whole document	1-12
P,X	AMADO RAFAEL G ET AL: "Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer" JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, vol. 26, no. 10, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 1626-1634, XP009104317 ISSN: 0732-183X the whole document	1-12

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/003312

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FRIDAY ET AL: "K-ras as a target for cancer therapy" BBA - REVIEWS ON CANCER, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 1756, no. 2, 25 November 2005 (2005-11-25), pages 127-144, XP005204727 ISSN: 0304-419X the whole document	1-12
A	CARAGLIA MICHELE ET AL: "EGF-R small inhibitors and anti-EGF-R antibodies: advantages and limits of a new avenue in anticancer therapy." RECENT PATENTS ON ANTI-CANCER DRUG DISCOVERY JUN 2006, vol. 1, no. 2, June 2006 (2006-06), pages 209-222, XP009104857 ISSN: 1574-8928 the whole document	1-12
A	CHUA YU JO ET AL: "Panitumumab" DRUGS OF TODAY, vol. 42, no. 11, November 2006 (2006-11), pages 711-719, XP002493245 ISSN: 1699-3993 the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2008/003312

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007001868 A	04-01-2007	CA 2612183 A1 EP 1913157 A1	04-01-2007 23-04-2008

フロントページの続き

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フリーマン ダニエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ニューブリー パーク グレイロック ストリート 942

(72)発明者 ホワン トッド

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ニューブリー パーク カレ サン ホワン 4629

(72)発明者 ラディンスキー ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウザンド オークス ラング ランチ パークウェイ 3574

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA02 HA14

4B063 QA17 QA19 QQ02 QQ43 QR32 QR40 QR55 QS33 QS38

4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 DA86 EA28