



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0032340
(43) 공개일자 2015년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2015-7004481
(22) 출원일자(국제) 2013년07월23일
심사청구일자 2015년02월23일
(85) 번역문제출일자 2015년02월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/051741
(87) 국제공개번호 WO 2014/018567
국제공개일자 2014년01월30일
(30) 우선권주장
61/675,303 2012년07월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
파마시클릭스, 인코포레이티드
미국 94085 캘리포니아 서니베일 이스트 아퀴스
에브뉴995
(72) 발명자
창 베티 와이.
미국 95014 캘리포니아주 쿠퍼티노 린드세이 애
비뉴 10375
부기 조셉 제이.
미국 94040 캘리포니아주 마운틴 뷰 마릴린 애비
뉴 1229
스테게르다 수잔 엠.
미국 94122 캘리포니아주 샌 프란시스코 8번 애비
뉴 1286
(74) 대리인
김진희, 김태홍

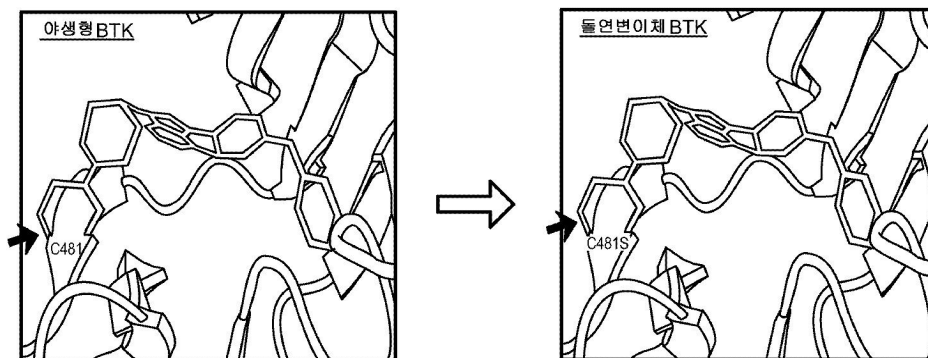
전체 청구항 수 : 총 158 항

(54) 발명의 명칭 브루톤 티로신 키나제(BTK)의 억제제에 대한 내성과 관련된 돌연변이

(57) 요약

BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 부여하는 돌연변이가 본원에 기재되어 있다. 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 감소된 억제를 나타내는(즉, 내성을 나타내는) 변경된 BTK 폴리펩티드가 본원에 기재되어 있다. BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 부여하는 PLC γ 2 및 CARD11 폴리펩티드의 변경도 본원에 기재되어 있다. 변경된 폴리펩티드, 및 변경된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 검출하는 진단 방법 및 이의 적용 방법도 본원에 기재되어 있다. 변경된 폴리펩티드를 함유하는 조성물, 조합물 및 키트, 및 변경된 폴리펩티드를 사용하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 제2 세대 BTK 억제제의 확인 및 디자인을 위한 스크리닝제로서 변경된 BTK 폴리펩티드를 사용하는 방법도 본원에 기재되어 있다.

대표도



(30) 우선권주장

61/682,688 2012년08월13일 미국(US)

61/780,652 2013년03월13일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

대상체가 공유(covalent) 및/또는 비가역적 브루톤 티로신 키나제(Bruton's Tyrosine Kinase; BTK) 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서,

(a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체가 암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 투여받은 것인 방법.

청구항 3

암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서,

(a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 4

제2 세대 BTK 억제제로 치료될 대상체를 선택하는 방법으로서,

(a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 제2 세대 BTK 억제제로 치료될 후보자로서 상기 대상체를 특징짓는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계, 또는 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 BTK를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK,

MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, C481에 결합하지 않는 BTK의 공유 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK의 가역적 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서의 아미노산 치환 또는 결실을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 결실을 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 서열번호 3에 기재된 뉴클레오티드 서열에서 핵산 위치 1635에 상응하는 핵산 위치에서 사이토신으로의 구아닌의 돌연변이를 갖거나, 서열번호 3에 기재된 뉴클레오티드 서열에서 핵산 위치 1634에 상응하는 핵산 위치에서 아데닌으로의 티민의 돌연변이를 갖는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 RNA 또는 DNA인 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, DNA가 게놈 DNA인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 시험이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 증폭을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 증폭이 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, PCR 증폭이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 영역을 플랭킹(f flank)하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용을 포함하는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 시험이 증폭된 핵산의 서열결정을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 시험이 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 것을 포함하고, 서열 특이적 핵산 프로브는

- (a) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고;
- (b) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 시험이 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함하는 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 대상체로부터의 하나 이상의 종양 세포를 함유하는 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유하는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플, 또는 골수 흡인물(aspirate)인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 공유 또는 비가역적 BTK 억제제가 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 공유 또는 비가역적 BTK 억제제가 이브루티닙(ibrutinib), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 암을 갖는 것인 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 암이 혈액암인 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 암이 B 세포 악성종양인 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 36

제34항 또는 제35항에 있어서, B 세포 악성종양이 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 종격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로블린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종, 또는 림프종모양 육아종증인 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 고형 종양을 갖는 것인 방법.

청구항 38

제2항, 제3항 및 제5항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여 후 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 전에 수득된 샘플인 방법.

청구항 39

제2항, 제3항 및 제5항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 수득되는 것인 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 대상체는 최초 투여시 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응하는 것인 방법.

청구항 41

변경된 BTK를 억제하는 화합물을 스크리닝하는 방법으로서,

(a) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 제공하는 단계;

(b) 상기 변경된 BTK를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및

(c) BTK 활성의 수준을 검출하는 단계로서, 이때 활성의 감소는 상기 화합물이 변경된 BTK를 억제함을 나타내는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 위치 481에서 아미노산의 치환 또는 결실인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메

티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스템인의 치환인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스템인의 치환인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 변경이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스템인의 치환인 방법.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 활성 수준의 검출이 시험관내 키나제 분석에 의해 평가되는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 키나제 분석에서 사용된 기질이 PLC γ , ERK1/2 또는 AKT인 방법.

청구항 48

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 변경된 BTK 폴리펩티드가 BTK와 시험 화합물의 접촉 전에 변경된 BTK 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포로부터 정제되는 것인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 숙주 세포가 변경된 BTK 폴리펩티드를 안정하게 발현하는 것인 방법.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 세포가 내생성 야생형 BTK의 발현을 결여하는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 세포가 포유동물 세포, 비-포유동물 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 세균 세포, 효모 세포 또는 식물 세포인 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 세포가 치킨 DT40 BTK +/- B 세포 또는 인간 BTK +/- B 세포인 방법.

청구항 53

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, BTK 활성을 갖는 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체로서, 상기 변경이 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 변경된 BTK 폴리펩티드 또는 변이체의 내성을 부여하는 것인 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 54

제53항에 있어서, 변경이 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 위치 481에서 아미노산의 치환을 포함하는 것인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 치환이 C481S인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 56

제53항에 있어서, 변경이 아미노산 위치 481의 결실을 포함하는 것인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 위치 481에서 아미노산의 치환 및 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함하는 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 위치 481의 아미노산이 시스테인이 아닌 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 정제된 단백질인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 60

제59항에 있어서, 세포로부터 정제된 것인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 61

제60항에 있어서, 세포가 포유동물 세포, 인간 세포, 세균 세포, 효모 세포, 조류 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 양서류 세포인 단리된 BTK 폴리펩티드.

청구항 62

제53항 내지 제61항 중 어느 한 항의 단리된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 63

제62항에 있어서, DNA 또는 RNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 64

제62항에 있어서, cDNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 위치 481의 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 변경됨으로써 상기 코돈이 시스테인을 코딩하지 않는 서열번호 3에 기재된 핵산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 가지며 위치 481의 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 시스테인을 코딩하지 않는 변이체를 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 66

제62항 또는 제63항에 있어서, 서열번호 7, 8, 22 또는 23에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 7, 8, 22 또는 23에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하고, 위치 481의 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 시스테인을 코딩하지 않는 단리된 핵산 분자.

청구항 67

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 68

제67항에 있어서, 바이러스 또는 플라스미드 벡터인 벡터.

청구항 69

제67항 또는 제68항에 있어서, 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 것인 벡터.

청구항 70

제62항 내지 제66항 중 어느 한 항의 핵산 분자 또는 제67항 내지 제69항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 71

제70항에 있어서, 원핵세포 또는 진핵세포인 숙주 세포.

청구항 72

제71항에 있어서, 포유동물 세포, 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 양서류 세포인 숙주 세포.

청구항 73

제72항에 있어서, 영장류 세포인 숙주 세포.

청구항 74

제73항에 있어서, 인간 세포인 숙주 세포.

청구항 75

제70항 내지 제74항 중 어느 한 항의 숙주 세포에 의해 발현된 돌연변이(mutant) BTK 폴리펩티드.

청구항 76

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항의 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 제62항 내지 제66항 중 어느 한 항의 핵산 분자를 포함하는 마이크로칩.

청구항 77

아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 또는 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트.

청구항 78

제77항에 있어서, BTK 폴리펩티드의 아미노산 481을 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 키트.

청구항 79

제77항에 있어서,

- (a) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고;
- (b) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 키트.

청구항 80

제77항에 있어서,

- (a) C481S인 변경을 갖는 변경된 BTK 폴리펩티드, 또는 C481S인 변경을 포함하는 이의 부분; 또는
- (b) C481S인 변경을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 또는 C481S인 변경을 포함하는 이의 부분을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 마이크로칩을 포함하는 키트.

청구항 81

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대해 내성인 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템.

청구항 82

제81항에 있어서, 마이크로어레이가 마이크로칩 상에 함유되어 있는 것인 시스템.

청구항 83

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대해 내성인 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) (i) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템.

청구항 84

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대해 내성인 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) BTK 폴리펩티드의 아미노산 481을 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템.

청구항 85

혈액암을 갖는 환자의 유지 치료(maintenance therapy) 방법으로서,

- (a) 치료 유효 용량의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 실시하는 단계; 및
- (b) 대상체가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 초래하는, BTK를 코딩하는 내생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 모니터링은, 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

제85항 또는 제86항에 있어서, 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 유지 치료 요법을 중단하는 단계, 또는 대상체가 돌연변이를 갖지 않는 경우 유지 치료 요법을 계속하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 88

제85항 또는 제86항에 있어서, 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 변경된 BTK를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 89

제85항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 90

제85항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, C481에 결합하지 않는 BTK의 공유 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 91

제85항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK의 가역적 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 92

제85항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 폴리펩티드의 변경이 C481S인 방법.

청구항 93

제85항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산의 돌연변이가 서열번호 3에 기재된 뉴클레오타이드 서열에서 핵산 위치 1635에 상응하는 핵산 위치에서 사이토신으로의 구아닌의 돌연변이이거나, 서열번호 3에 기재된 뉴클레오타이드 서열에서 핵산 위치 1634에 상응하는 핵산 위치에서 아데닌으로의 티민의 돌연변이인 방법.

청구항 94

제85항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 예정된 시간 간격이 매주, 매달, 매 2개월, 매 3개월, 매 4개월, 매 5개월, 매 6개월, 매 7개월, 매 8개월, 매 9개월, 매 10개월, 매 11개월, 또는 매년인 방법.

청구항 95

제85항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 하나 이상의 암세포를 함유하는 것인 방법.

청구항 96

제85항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 ctDNA를 함유하는 것인 방법.

청구항 97

제85항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 전에 대상체로부터의 샘플을 시험하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 98

제85항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 혈액암이 B 세포 악성종양인 방법.

청구항 99

제85항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 백혈병, 림프종 또는 골수종인 방법.

청구항 100

제85항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 중격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 중격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종, 또는 림프종모양 육아종증인 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, B 세포 악성종양이 CLL인 방법.

청구항 102

제85항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제가 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 103

제102항에 있어서, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 유지 치료 요법이 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 105

대상체가 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서,

(a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 106

암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서,

(a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 107

암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서,

(a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및

(b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계

를 포함하는 방법.

청구항 108

제105항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, PLC γ 2 폴리펩티드의 변경이 R665W 또는 S707F인 방법.

청구항 109

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 변경된 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 서열번호 26에 기재된 뉴클레오티드 서열에서 핵산 위치 1993에 상응하는 핵산 위치에서 티미딘으로의 사이토신의 돌연변이를 갖거나, 서열번호 26에 기재된 뉴클레오티드 서열에서 핵산 위치 2120에 상응하는 핵산 위치에서 티미딘으로의 사이토신의 돌연변이를 갖는 것인 방법.

청구항 110

제105항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 가역적 또는 비가역적 BTK 억제제인 방법.

청구항 111

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 공유 BTK 억제제인 방법.

청구항 112

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 것인 방법.

청구항 113

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 114

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 115

서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, PLC γ 2 활성을 갖는 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 변이체로서, 상기 변경이 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 암세포의 내성을 부여하는 것인 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 116

제115항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙인 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드.

청구항 117

제115항 또는 제116항에 있어서, 서열번호 17에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 17에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 위치 665의 아미노산이 아르기닌이 아닌 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드.

청구항 118

제117항에 있어서, 위치 665의 아미노산이 트립토판인 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드.

청구항 119

제115항 또는 제116항에 있어서, 서열번호 18에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 18에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 위치 707의 아미노산이 세린이 아닌 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드.

청구항 120

제119항에 있어서, 위치 707의 아미노산이 페닐알라닌인 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드.

청구항 121

제115항 내지 제120항 중 어느 한 항의 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 122

제121항에 있어서, DNA 또는 RNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 123

제121항에 있어서, cDNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 124

제121항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 26 또는 27에 기재된 핵산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 26 또는 27에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 위치 665의 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 아르기닌을 코딩하지 않거나 위치 707의 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 세린을 코딩하지 않는 단리된 핵산 분자.

청구항 125

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
 - (b) 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이
- 를 포함하는 시스템.

청구항 126

제125항에 있어서, 마이크로어레이가 마이크로칩 상에 함유되어 있는 것인 시스템.

청구항 127

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) (i) 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 갖거나 아미노산 위치 707에서 세린을 갖는 야생형 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브

를 포함하는 시스템.

청구항 128

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 665 또는 아미노산 707을 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머

를 포함하는 시스템.

청구항 129

제125항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, PLC γ 2 폴리펩티드의 변형이 R665W 또는 S707F인 시스템.

청구항 130

혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서,

- (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 실시하는 단계; 및
- (b) 대상체가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 초래하는, PLC γ 2를 코딩하는 내생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 상기 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법.

청구항 131

제129항에 있어서, PLC γ 2 폴리펩티드의 변형이 R665W 또는 S707F인 방법.

청구항 132

대상체가 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서,

- (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및
- (b) 상기 대상체가 아미노산 위치 232에서 변형을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법.

청구항 133

암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서,

- (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및
- (b) 상기 대상체가 아미노산 위치 232에서 변형을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법.

청구항 134

암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서,

- (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및
- (b) 상기 대상체가 상기 변형을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 아미노산 위치 232에서 변형을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 135

제132항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, CARD11 폴리펩티드의 변형이 서열번호 19에 기재된 아미노산 서

열의 아미노산 232 다음에 아미노산의 삽입인 방법.

청구항 136

제132항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, CARD11 폴리펩티드의 변경이 L232LL인 방법.

청구항 137

제132항 내지 제136항 중 어느 한 항에 있어서, 변경된 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 서열번호 24에 기재된 뉴클레오타이드 서열에서 핵산 위치 694에 상응하는 핵산 위치에서 3개의 티미딘 뉴클레오타이드의 삽입을 갖는 것인 방법.

청구항 138

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 가역적 또는 비가역적 BTK 억제제인 방법.

청구항 139

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 공유 BTK 억제제인 방법.

청구항 140

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 것인 방법.

청구항 141

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 142

제132항 내지 제137항 중 어느 한 항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 143

서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, CARD11 활성을 갖는 단리된 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 변이체로서, 상기 변경이 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 암세포의 내성을 부여하는 것인 단리된 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 변이체.

청구항 144

제143항에 있어서, BTK 억제제가 이브루티닙인 단리된 CARD11 폴리펩티드.

청구항 145

제143항 또는 제144항에 있어서, 서열번호 20에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 20에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 단리된 CARD11 폴리펩티드.

청구항 146

제145항에 있어서, 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열에 비해 아미노산 232 다음에 아미노산의 삽입을 갖는 단리된 CARD11 폴리펩티드.

청구항 147

제146항에 있어서, 아미노산이 류신인 단리된 CARD11 폴리펩티드.

청구항 148

제143항 내지 제147항 중 어느 한 항의 단리된 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 149

제148항에 있어서, DNA 또는 RNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 150

제148항에 있어서, cDNA 분자인 단리된 핵산 분자.

청구항 151

제148항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 서열번호 25에 기재된 핵산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 25에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대해 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 152

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 변경된 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템.

청구항 153

제152항에 있어서, 마이크로어레이가 마이크로칩 상에 함유되어 있는 것인 시스템.

청구항 154

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) (i) 아미노산 위치 232에서 변경되어 있는 변경된 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템.

청구항 155

대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서,

- (a) 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및
- (b) CARD11 폴리펩티드의 아미노산 232를 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템.

청구항 156

제152항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, CARD11 폴리펩티드의 변경이 L232LL인 시스템.

청구항 157

혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서,

- (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 실시하는 단계;

및

(b) 대상체가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 초래하는, CARD11을 코딩하는 내생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계

를 포함하는 유지 치료 방법.

청구항 158

제157항에 있어서, CARD11 폴리펩티드의 변경이 L232LL인 방법.

명세서

기술분야

[0001]

교차참조

[0002]

본원은 2012년 7월 24일자로 출원된 미국 가출원 제61/675,303호, 2012년 8월 13일자로 출원된 미국 가출원 제 61/682,688호 및 2013년 3월 13일자로 출원된 미국 가출원 제61/780,652호(이들 모두 온전히 그대로 참고로 도입됨)의 이익을 주장한다.

[0003]

EFS-웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열목록의 참고도입

[0004]

본원은 EFS-웹을 통해 ASCII 형식의 컴퓨터 판독가능한 텍스트 파일로서 제출되었고 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 서열목록을 함유한다. 2013년 7월 22일자로 생성된 상기 텍스트 파일은 25922-865-601seqlist.txt로서 명명되고 그의 크기는 130 KB이다.

배경기술

[0005]

브루톤 티로신 키나제(BTK)는 B 세포, 골수 세포 및 비만 세포의 성장, 분화 및 활성화에 결정적으로 중요한 비-수용체 티로신 키나제의 Tec 패밀리의 구성원이다. BTK 유전자는 세포유전학 밴드 Xq21.33-q22에 위치하고, 전체 길이 BTK 단백질을 코딩하는, 37 kb에 걸쳐 있는 19개의 엑손들을 포함한다. BTK에서의 돌연변이는 인간에서 공지되어 있고 면역학적 장애인 X-연관된 무감마글로불린혈증을 발생시킨다.

[0006]

BTK는 PIP₃(포스파티딜이노시톨-3,4,5-트리포스페이트) 발생 및 BTK 플렉스트린(pleckstrin) 상동성(PH) 도메인과의 결합에 의해 자극된 막 편재화, 및 Src 패밀리 키나제에 의한 Tyr-551의 트랜스인산화에 의해 활성화된다. 활성화된 BTK는 Ca²⁺ 이동, mRNA 안정화, 및 NF-κB 및 AP-1 전사 인자의 유도를 유발하는, PLC γ, JNK 및 p38 MAPK 경로에 관여하는 다수의 신호전달 분자들의 인산화에 관여한다. BTK 활성화는 BTK의 억제제(IBTK), Sab 및 c-Cbl을 비롯한 다수의 단백질들에 의해 음성적으로 조절된다. 항원 챌린지 동안 고전적인 NF-κB 경로는 CARD11, MALT1 및 BCL10으로 구성된 "CBM" 신호전달 복합체의 형성을 통해 B 세포 수용체 신호전달에 의해 강하게 활성화된다. CBM은 BTK의 PLC γ 활성화의 다운스트림에 위치한다. CBM 경로는 여러 림프종 아류형들에서 병리학적으로 변경되어 있고; CARD11에서의 돌연변이는 다운스트림 NF-κB 신호전달을 항시적으로 활성화시키는 것으로 밝혀졌다.

[0007]

BTK는 B 세포 수용체(BCR) 신호전달에 필수적이고 넉아웃 마우스 모델에서 그의 돌연변이는 B 세포 특이적 표현형을 갖는다. BTK 단백질 및 mRNA는 정상 B 세포에 비해 만성 림프구성 백혈병(CLL)에서 유의하게 과다발현된다. BTK가 CLL 세포에서 항상 항시적으로 활성을 나타내지는 않지만, B 세포 수용체(BCR) 또는 CD40 신호전달은 이 경로의 효과적인 활성화를 동반한다. BTK 활성화는 B 세포 악성종양, 예컨대, 비-호지킨 림프종, 예컨대, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 맨틀 세포 백혈병(MCL), 소포 림프종(FL) 및 미만성 거대 B 세포 림프종((DLBCL) 및 다발성 골수종(MM)의 질환 진행에 관여한다.

발명의 내용

[0008]

브루톤 티로신 키나제(BTK)의 억제제를 사용한 환자의 치료에 대한 환자의 내성을 부여하는, B 세포 수용체 경로의 돌연변이의 확인이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 BTK에 공유적으로 및/또는 비가역적으로 결합하는 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 BTK의 시스테인 481에 공유적으로 및/또는 비가역적으로 결합하는 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(ibrutinib)이다. 일

부 실시양태에서, 환자는 B 세포 증식 장애를 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 B 세포 악성종양을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 백혈병 또는 림프종을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 비-호지킨 림프종을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 만성 림프구성 백혈병(CLL), 맨틀 세포 백혈병(MCL), 소포 림프종(FL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 다발성 골수종(MM)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 환자는 고형 종양, 예컨대, 암종 또는 육종을 갖는다.

[0009]

브루톤 티로신 키나제(BTK)의 시스테인 481에 공유적으로 및/또는 비가역적으로 결합하는 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 상기 키나제의 내성을 부여하는 BTK의 돌연변이의 확인이 본원에 기재되어 있다. 단리된 돌연변이(mutant) BTK 폴리펩티드, 및 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산이 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 돌연변이의 확인은 BTK 억제제 치료를 위한 환자의 선택, BTK 억제제 치료를 제공받는 환자의 모니터링 및 BTK 억제제 치료 요법의 변경을 가능하게 한다. 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 및 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 검출하는 진단 방법, 및 이러한 방법의 용도가 본원에 기재되어 있다. 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제의 확인 방법도 본원에 기재되어 있다.

[0010]

특정 실시양태에서, 대상체가 공유(covalent) 및/또는 비가역적 브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는(characterizing) 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0011]

특정 실시양태에서, 대상체에서 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 것으로서 BTK를 특징짓는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 것으로서 BTK를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0012]

특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0013]

특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양

태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제를 사용한 치료를 위해 대상체를 선택하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변형을 갖는 경우 제2 세대 BTK 억제제를 사용한 치료를 위한 후보자로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서의 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 결실을 포함한다.

[0016] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머들의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.

[0018] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함한다.

[0019] 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 종양 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유한다.

[0020] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법에서 사용되는 핵산은 대상체로부터 수득된 종양 세포 샘플로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 골수 흡인물이다.

[0021] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0022] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 중격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포(hairy cell) 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발렌스트롬 마크로글로블린혈증,

비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종, 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.

[0023]

상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 샘플을 수득하기 전에 비가역적 BTK 억제제로 치료받는다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 후에 수득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 수득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비가역적 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 상기 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.

[0024]

특정 실시양태에서, 변경된 BTK를 억제하는 화합물을 스크리닝하는 방법으로서, (a) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 제공하는 단계; (b) 상기 변경된 BTK를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 (c) BTK 활성의 수준을 검출하는 단계로서, 이때 활성의 감소는 상기 화합물이 변경된 BTK를 억제한다는 것을 표시하는 것인 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드의 위치 481에서의 아미노산 치환 또는 결실이다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 트레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, BTK 활성의 수준의 검출은 시험관내 키나제 분석에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 키나제 분석에서 사용된 기질은 PLC γ , ERK1/2 또는 AKT이다. 일부 실시양태에서, 키나제 분석에서 사용된 기질은 펩티드 기질이다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 음성 대조군으로서 사용된다.

[0025]

일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 BTK를 시험 화합물과 접촉시키기 전에 변경된 BTK 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포로부터 정제된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 변경된 BTK 폴리펩티드를 안정하게 발현한다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 면역친화성 또는 크로마토그래피에 의해 정제된다. 일부 실시양태에서, 세포는 내생성 야생형 BTK의 발현을 결여(deficient)한다. 일부 실시양태에서, 세포는 치킨 DT40 BTK +/- B 세포 또는 인간 BTK +/- B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 비-B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 비-B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CHO 세포 또는 주르카트(Jurkat) T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 비-포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 곤충 세포, 세균 세포, 효모 세포 또는 식물 세포이다.

[0026]

특정 실시양태에서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, BTK 활성을 갖는 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체가 본원에 기재되어 있고, 이때 상기 변경은 공유 및/또는 가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 상기 변경된 BTK 폴리펩티드 또는 변이체의 내성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 암세포의 내성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 위치 481에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 치환은 C481S이다. 일부 실시양태에서, 변경은 아미노산 위치 481의 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 위치 481에서 아미노산 치환을 포함하고 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481의 아미노산은 시스테인이 아니다. 일부 실시양태에서, 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체는 재조합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체는 정제된 단백질이다. 일부 실시양태에서, 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체는 세포로부터 정제된다. 일부 실시양태에서, 세포는 원핵세포 또는 진핵세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 양서류 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 영장류 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다.

[0027]

특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 cDNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 PCR 증폭 생성물이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 재조합 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵

산은 합성 분자이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 3에 기재된 핵산 서열(이때, 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 변경됨으로써, 상기 코돈이 시스테인을 코딩하지 않음), 또는 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체(이때, 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈은 시스테인을 코딩하지 않음)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 7에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 7에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈은 시스테인을 코딩하지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 8에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 8에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈은 시스테인을 코딩하지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 22에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 22에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈은 시스테인을 코딩하지 않는다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 23에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 23에 기재된 서열을 갖는 핵산에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈은 시스테인을 코딩하지 않는다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다.

[0028] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 바이러스 또는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 항시성 또는 유도성 프로모터이다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포, 또는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 원핵세포 또는 진핵세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포, 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포 또는 양서류 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 영장류 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 세포이다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포에 의해 발현된 돌연변이 BTK 폴리펩티드가 본원에 기재되어 있다.

[0029] 특정 실시양태에서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, BTK 활성을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체를 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0030] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 또는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0031] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 단리된 핵산 또는 이러한 핵산을 포함하는 벡터를 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0032] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 변경된 BTK 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 C481S인 변경을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩을 포함한다.

[0033] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 C481S인 변경을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.

[0034] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 변경된 BTK 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체로서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 야생형 BTK 폴리펩티드에 결합하지 않거나 낮은 친화성으로 결합하는 단리된 항체가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0035] 특정 실시양태에서, 대상체에서 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서, (a) 상기 대상체로부터 획득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유

하는 샘플; 및 (b) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다.

[0036]

특정 실시양태에서, 대상체에서 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서, (a) 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고 (ii) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.

[0037]

특정 실시양태에서, 대상체에서 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 변경된 BTK를 검출하는 시스템으로서, (a) 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) BTK 폴리펩티드의 아미노산 481을 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.

[0038]

특정 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a) 치료 유효 용량의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 대상체가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 초래하는, BTK를 코딩하는 나생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 유지 치료 요법을 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖지 않는 경우 유지 치료 요법을 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 변경된 BTK를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드의 변경은 C481S이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 돌연변이는 서열번호 3에 기재된 뉴클레오타이드 서열에서 핵산 위치 1635에 상응하는 핵산 위치에서 사이토신으로의 구아닌의 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 핵산의 돌연변이는 서열번호 3에 기재된 뉴클레오타이드 서열에서 핵산 위치 1634에 상응하는 핵산 위치에서 아데닌으로의 티민의 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 예정된 시간 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월 또는 1년이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 암세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 ctDNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 전에 대상체로부터의 샘플을 시험하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 혈액암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 또는 골수종이다. 일부 실시양태에서, 암은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 종격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구 림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL)이다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙이다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 140 mg, 하루에 420 mg, 하루에 560 mg 또는 하루에 840 mg의 1일 용량으로 투여된다.

- [0039] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2의 R665W 또는 S707F 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.
- [0040] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2의 R665W 또는 S707F 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.
- [0041] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 핵산 분자는 cDNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 분리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0042] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707을 코딩하는 핵산의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707을 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.
- [0043] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 665에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 아미노산 위치 665 또는 707에서 아르기닌을 갖는 야생형 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 종양 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유한다.
- [0045] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법에서 사용되는 핵산은 대상체로부터 수득된 종양 세포 샘플로부터 분리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 골수 흡인물이다.
- [0046] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 억제제는 이브루티닙이다.
- [0047] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB

DLBCL), 일차성 종격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.

[0048] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 샘플을 획득하기 전에 BTK 억제제로 치료받는다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 후에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 획득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.

[0049] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 665에서 변경을 포함하는 변경된 PLC γ 2 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 R665W 또는 S707F인 변경을 갖는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩을 포함한다.

[0050] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 포함하는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 R665W 또는 S707F인 변경을 갖는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.

[0051] 특정 실시양태에서, 대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다.

[0052] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 갖거나 위치 707에서 세린을 갖는 야생형 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.

[0053] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 665 또는 707을 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.

[0054] 특정 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 대상체가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 초래하는, PLC γ 2를 코딩하는 내생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 상기 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 획득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드의 변경은 R665W 또는 S707F이다. 일부 실시양태에서, 예정된 시간 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월이다.

- [0055] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 140 mg, 하루에 420 mg, 하루에 560 mg 또는 하루에 840 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙이다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 CARD11 내의 L232LL 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.
- [0057] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 CARD11 내의 L232LL 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.
- [0058] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 cDNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0059] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232를 코딩하는 핵산의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232를 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.
- [0060] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 232에서 변경되어 있는 변경된 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 야생형 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함한다.
- [0061] 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 종양 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유한다.
- [0062] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법에서 사용되는 핵산은 대상체로부터 수득된 종양 세포 샘플로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 골수

흡인물이다.

- [0063] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CARD11 억제제는 이브루티닙이다.
- [0064] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 종격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.
- [0065] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 샘플을 획득하기 전에 BTK 억제제로 치료받는다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 후에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 획득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.
- [0066] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 232에서 변경을 포함하는 변경된 CARD11 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 L232LL인 변경을 갖는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0067] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 232에서 변경을 포함하는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 L232LL인 변경을 갖는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0068] 특정 실시양태에서, 대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다.
- [0069] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 232에서 변경되어 있는 변경된 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 야생형 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.
- [0070] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) CARD11 폴리펩티드의 아미노산 232를 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.
- [0071] 특정 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 대상체가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 초래하는, CARD11을 코딩하는 내생성 유전자 내의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이

를 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF- κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CARD11 폴리펩티드의 변경은 L232LL이다. 일부 실시양태에서, 예정된 시간 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월이다.

[0072]

일부 실시양태에서, BTK 억제제는 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 140 mg, 하루에 420 mg, 하루에 560 mg 또는 하루에 840 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙이다.

도면의 간단한 설명

[0073]

도 1은 이브루티닙을 사용한 야생형 BTK 및 돌연변이체 BTK의 구조 모델링을 보여준다. 적색 화살표는 파괴된 공유결합을 표시한다.

도 2a 내지 2c는 BTK 돌연변이가 BCR 신호전달 경로의 재활성화 및 유전자 발현의 변화를 유발한다는 것을 입증한다. 도 2a는 4개의 일련의 샘플들에서 BTK 인산화 및 다운스트림 BCR 신호전달의 면역블롯을 보여준다. GAPDH는 적재 대조군으로서 포함되었다. 도 2b는 모든 4개의 일련의 샘플들에 걸쳐 27-유전자 BCR 시그너처(signature)의 발현 프로파일을 갖는 그래픽 열 맵을 보여준다. RPKM-표준화된 발현 카운트는 아래에 표시된 색채 기준 범위를 이용함으로써 색채로 표시되었다. 도 2c: BCR 시그너처의 클러스터 내의 각각의 개별 유전자에 대한 RPKM-표준화된 발현 카운트가 작도되었다. 4개의 표본들 사이의 차이는 일원 분산분석(ANOVA)에 의해 분석되었다. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

도 3a 내지 3c: BTK 돌연변이는 다른 BCR 억제제에 민감한 상태를 유지하는 증가된 생체의 세포 증식을 유발한다. 도 3a: 환자 임상 경과에 걸쳐 Ki67+ CLL 세포의 세포방향 변화. 도 3b: 시험관내 간질-유도된 증식이 반응 전 샘플 및 반응 샘플에서는 이브루티닙에 의해 제거되었으나 재발된 샘플에서 제거되지 않았다. 이브루티닙의 농도는 각각의 열의 상부에 표시되어 있다. BrdU+ 세포의 백분율은 각각의 도표에 표시되어 있다. Iso는 동종형 대조군을 의미한다. 도 3c: CLL 증식에 대한 다른 키나제 억제제의 효과. 실험에서 사용된 농도가 표시되었다. 비처리된 세포(+NK)는 대조군으로서 사용되었다. PRT060318은 SYK 억제제이고; PRT062070은 SYK/JAK 이중 억제제이고; CAL101은 PI3K δ 억제제이고; 토파시티닙(tofacitinib)은 JAK 억제제이고; 다사티닙은 다중-키나제 억제제이다.

도 4: 이브루티닙을 사용한 치료 다음에 재발 후 증가된 증식을 반영하는 세포 크기의 변화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0074]

특정 용어

[0075]

달리 정의되어 있지 않은 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 청구된 보호대상이 속하는 분야에서 숙련된 자에 의해 통상적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 본원 전체의 개시내용에 걸쳐 참조된 모든 특허, 특허출원, 공개된 출원 및 공개문헌, 진뱅크(GENBANK) 서열, 웹사이트 및 다른 공개된 자료는 온전히 그대로 참고로 도입된다. 본원에서 용어에 대한 다수의 정의가 존재하는 경우, 이 단락에 기재된 정의가 우선한다. URL 또는 다른 이러한 식별자 또는 주소가 언급되는 경우, 이러한 식별자는 변화할 수 있고 인터넷 상의 특정 정보는 변천될 수 있지만, 동등한 정보가 공지되어 있고, 예컨대, 인터넷 및/또는 적절한 데이터베이스의 검색에 의해 용이하게 접근될 수 있다는 것이 이해된다. 이에 대한 언급은 이러한 정보의 이용가능성 및 공개적 배포를 입증한다. 일반적으로, 세포 배양, 세포 감염, 항체 제조 및 분자생물학 방법의 절차는 당분야에서 통상적으로 이용되는 방법이다. 이러한 표준 기법은 예를 들면, 참고 매뉴얼, 예컨대, 문헌(Sambrook et al. (2000)) 및 문헌(Ausubel et al. (1994))에서 발견될 수 있다.

[0076]

본원에서 사용된 바와 같이, 문맥이 달리 명시하고 있지 않은 한, 단수형 "하나", "한" 및 "상기 하나"는 복수형 지시대상을 포함한다. 달리 구체적으로 언급되어 있지 않은 한, 단수형의 사용은 복수형을 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 언급되어 있지 않은 한, "또는"의 사용은 "및/또는"을 의미한다. 나아가, 용어 "포함하는" 및 다른 형태(예를 들면, "포함한다", "포함하고" 및 "포함된다")의 사용은 한정하기 위한 것이

아니다.

- [0077] 본원에서 사용된 바와 같이, 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로서 표현될 수 있다. "약"은 정확한 양도 포함한다. 따라서, "약 5 μg "은 "약 5 μg " 및 "5 μg "을 의미한다. 일반적으로, 용어 "약"은 실험 오차 내에 있을 것으로 예상되는 양을 포함한다.
- [0078] 본원에서 사용된 바와 같이, 브루톤 티로신 키나제(BTK) 폴리펩티드는 재조합 제조된 단백질, 합성 제조된 단백질, 천연 BTK 단백질, 및 세포 또는 조직으로부터 추출된 BTK 단백질을 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 BTK 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. BTK 폴리펩티드는 인간 및 비-인간으로부터 유래된 동물들을 포함하나 이들로 한정되지 않는 상이한 종들의 관련된 폴리펩티드들을 포함한다. 비-인간으로부터 유래된 BTK 폴리펩티드는 비-인간 영장류(예를 들면, 침팬지 및 유인원), 무린(예를 들면, 마우스 및 래트), 개과 동물(개), 고양이과 동물(고양이), 토끼과 동물(토끼), 조류(새), 소과 동물(소), 양과 동물(양), 돼지과 동물(돼지), 말과 동물(말), 어류(물고기), 양서류(개구리) 및 다른 포유동물 또는 비-포유동물 BTK 폴리펩티드들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 예시적인 BTK 폴리펩티드는 예를 들면, 마우스로부터의 오르톨로그(ortholog)(유전자은행 등록번호 AAB47246), 개로부터의 오르톨로그(유전자은행 등록번호 XP_549139), 래트로부터의 오르톨로그(유전자은행 등록번호 NP_001007799), 닭으로부터의 오르톨로그(유전자은행 등록번호 NP_989564) 또는 제브라 피쉬로부터의 오르톨로그(유전자은행 등록번호 XP_698117), 및 브루톤 티로신 키나제의 하나 이상의 기질(예를 들면, 아미노산 서열 "AVLESEEEYSSARQ"를 갖는 펩티드 기질)에 대한 키나제 활성을 나타내는 상기 오르톨로그들 중 임의의 오르톨로그의 융합 단백질을 포함한다. 예시적인 BTK 폴리펩티드는 서열번호 1, 2 및 4 내지 6을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK, 대립형질 변이체 동종형, 체세포 돌연변이(종양 또는 혈액 악성종양에서 발견된 체세포 돌연변이를 포함함), 핵산으로부터의 합성 분자, 인간 조직 및 세포로부터 단리된 단백질, 및 이들의 변경된 형태를 포함한다. 본원에서 제공된 BTK 폴리펩티드는 일차 아미노산 서열의 변경, 또는 하나 이상의 아미노산의 결실, 추가 또는 치환에 의해 더 변경될 수 있다. BTK 폴리펩티드는 BTK 활성, 예컨대, 키나제 활성을 갖는 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 포함한다.
- [0079] 본원에서 사용된 바와 같이, 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 돌연변이체 BTK 단백질, 변경된 BTK 폴리펩티드 또는 변경된 BTK 단백질은 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 하나 이상의 아미노산 위치에서 변경되어 있는 BTK 폴리펩티드를 지칭한다. 예시적인 변경은 아미노산의 치환, 결실 또는 추가를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "BTK 억제제" 또는 "BTK 길항제"는 BTK 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 억제하거나 감소시키는 물질을 지칭한다. BTK 활성은 직접적 활성 및 간접적 활성을 포함한다. 예시적인 직접적 활성은 표적 분자와의 회합 또는 표적 기질의 인산화(즉, 키나제 활성)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 예시적인 간접적 활성은 다운스트림 생물학적 사건의 활성화 또는 억제, 예를 들면, NF- κ B에 의해 매개된 유전자 전사의 활성화를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0081] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "비가역적 억제제"는 표적 단백질(예를 들면, 키나제)과의 접촉 시 상기 단백질과의 또는 상기 단백질 내에서의 새로운 공유결합의 형성을 야기함으로써, 비가역적 억제제의 후속 존재 또는 부재에도 불구하고 표적 단백질의 생물학적 활성들 중 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들면, 포스포트랜스퍼라제 활성)을 감소시키거나 제거하는 화합물을 지칭한다.
- [0082] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "비가역적 BTK 억제제"는 BTK의 아미노산 잔기와 공유결합을 형성할 수 있는 BTK의 억제제를 지칭한다. 한 실시양태에서, BTK의 비가역적 억제제는 BTK의 시스테인 잔기와 공유결합을 형성할 수 있고; 특정 실시양태에서, 비가역적 억제제는 BTK의 시스테인 481 잔기(또는 이의 상동체), 또는 또 다른 티로신 키나제의 상동성 상응하는 위치에 있는 시스테인 잔기와 공유결합을 형성할 수 있다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같이, BTK 활성의 억제는 억제제의 부재 하에서의 BTK 활성에 비해 억제제의 존재 하에서의 BTK 활성의 임의의 감소를 지칭한다.
- [0084] 본원에서 사용된 바와 같이, 어구 "공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 내성을 부여하는"은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 BTK의 민감성의 임의의 감소를 지칭한다. 본원에서 제공된 일부 실시양태에서, 시스테인 481에서의 BTK의 변경은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 내성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 억제제와 BTK의 결합을 방해한다. 일부 실시양태에서, 상기 억제제는 BTK에 가역적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK와의 결합에 대한 억제제의 친화성은 야생형 BTK와의 결합에 비해 상대적으로 감소된다.
- [0085] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제2 세대 BTK 억제제"는 시스테인 481에서 아미노산 변경을 함유하는 BTK 폴

리펩티드의 하나 이상의 활성을 억제하는 물질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드의 활성도 억제한다. 일부 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드의 활성을 억제하지 않는다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "제1 세대 BTK 억제제"는 야생형 BTK 폴리펩티드의 활성을 억제하나 시스테인 481에서 아미노산 변경을 함유하는 BTK 폴리펩티드에 대한 감소된 억제를 나타내는 물질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 제1 세대 BTK 억제제는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다.

[0087] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는, 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예로는 B 세포 림프증식 장애(BCLD), 예컨대, 림프종 및 백혈병, 및 고형 종양이 있으나 이들로 한정되지 않는다. "B 세포 관련 암" 또는 "B 세포 계통의 암"은 이상조절된 또는 비조절된 세포 생장이 B 세포와 관련되어 있는 임의의 종류의 암을 의미한다.

[0088] 암과 관련하여 "불응성"은 특정 암이 특정 치료제를 사용한 치료에 대한 내성 또는 비반응성을 나타낸다는 것을 의미한다. 암은 특정 치료제를 사용한 치료의 시작부터 상기 특정 치료제를 사용한 치료에 대한 불응성(즉, 상기 치료제에의 초기 노출에 대한 비반응성)을 나타낼 수 있거나, 상기 치료제를 사용한 최초 치료 기간의 경과에 걸쳐 또는 상기 치료제를 사용한 후속 치료 기간 동안 상기 치료제에 대한 내성을 발생시킨 결과로서 상기 특정 치료제를 사용한 치료에 대한 불응성을 나타낼 수 있다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이, "유지 치료"는 초기 치료에 대한 유리한 반응, 예를 들면, 관해 후 재발(암의 재발)의 위험을 낮추는 것을 돕기 위한 화학치료 또는 또 다른 치료의 계속되는 사용을 의미한다. 유지 치료는 진행된 암(예를 들면, 치유될 수 없는 암)이 더 성장하고 퍼지는 것을 방지하도록 상기 진행된 암을 갖는 환자를 위해 사용될 수 있다.

[0090] "BTK-매개된 신호전달"은 BTK의 활성에 직접적으로 또는 간접적으로 의존하는 생물학적 활성들 중 임의의 생물학적 활성을 의미한다. BTK-매개된 신호전달의 예는 BTK 발현 세포의 증식 및 생존, 및 BTK 발현 세포 내에서의 하나 이상의 BTK 신호전달 경로의 자극을 유발하는 신호이다.

[0091] BTK "신호전달 경로" 또는 "신호 전달도입 경로"는 BTK의 활성으로부터 발생되고 신호 경로를 통해 전달되었을 때 신호전달 캐스케이드(cascade)에서 하나 이상의 다운스트림 분자의 활성화를 유발하는 신호를 발생시키는 하나 이상의 생화학적 반응 또는 생화학적 반응 군을 의미하기 위한 것이다. 신호 전달도입 경로는 세포의 원형질막을 가로질러 세포 표면으로부터의 신호 전달, 일련의 신호 전달도입 분자 중 하나 이상의 신호 전달도입 분자를 통한 신호 전달, 세포의 세포질을 통한 신호 전달 및 일부 경우 세포 핵 내로의 신호 전달을 유발하는 다수의 신호 전달도입 분자를 포함한다. 본 발명에서 특히 관심을 갖는 것은 궁극적으로 NF- κ B 신호전달 경로를 통한 NF- κ B의 활성화를 조절하는(향상시키거나 억제하는) BTK 신호 전달도입 경로이다.

[0092] 용어 "핵산"은 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드, 및 단일 또는 이중 가닥 형태의 이들의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 한정되지 않는 한, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 성질을 갖고 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 구체적으로 한정되지 않는 한, 상기 용어는 안티센스 기술에서 사용되는 DNA(예를 들면, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트)의 유사체인 PNA(펩티도핵산)를 비롯한 올리고뉴클레오타이드 유사체도 지칭한다. 달리 표시되어 있지 않은 한, 특정 핵산 서열은 이의 보존적으로 변경된 변이체(축퇴 코돈 치환을 포함하나 이것으로 한정되지 않음) 및 상보적 서열뿐만 아니라 명확히 표시된 서열도 함축적으로 포괄한다. 구체적으로 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환되어 있는 서열을 발생시킴으로써 달성된다(Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608; and Cassol et al. (1992) Mol. Cell. Probes 6, 327-331; and Rossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98).

[0093] 용어 "아미노산"은 천연 발생 아미노산 및 비천연 발생 아미노산뿐만 아니라, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 작용하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체(mimetics)도 지칭한다. 천연적으로 코딩된 아미노산은 20종의 아미노산들(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 쓰레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린), 피로라이신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학구조, 즉 수소에 결합된 α 탄소, 카복실 기, 아미노 기 및 R 기를 갖는 물질, 예를 들면, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폰사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 이러한 유사체는 변경된 R 기(예컨대, 노르류신) 또는 변경된 펩티드

골격을 갖지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학구조를 보유한다.

- [0094] 아미노산들은 본원에서 그들의 통상적으로 공지된 3-문자 부호, 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명위원회에 의해 권장된 1-문자 부호로 지칭된다. 마찬가지로, 뉴클레오타이드들은 그들의 통상적으로 허용되는 1-문자 코드로 지칭된다.
- [0095] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어들은 천연 발생 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 발생 아미노산, 예를 들면, 아미노산 유사체인 아미노산 중합체에도 적용된다. 상기 용어들은 전체 길이 단백질을 비롯한 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포괄하고, 이때 아미노산 잔기들은 공유 펩티드 결합에 의해 연결된다.
- [0096] 본원에서 사용된 바와 같이, 변경은 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열의 변경을 지칭하고, 각각 아미노산 및 뉴클레오타이드의 결실, 삽입 및 치환을 포함한다.
- [0097] 2개의 아미노산 서열들 또는 2개의 핵산들의 % 상동성을 측정하기 위해, 최적 비교를 목적으로 상기 서열들을 정렬할 수 있다(예를 들면, 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 갭이 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열 내에 도입된다). 그 다음, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교할 수 있다. 제1 서열 내의 위치가 제2 서열 내의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유되어 있는 경우, 분자들은 그 위치에서 동일하다. 2개의 서열들 사이의 % 상동성은 상기 서열들에 의해 공유된 동일한 위치의 수의 함수(즉, % 동일성 = 동일한 위치의 수/위치(예를 들면, 중첩 위치)의 총 수 X 100)이다. 일부 실시양태에서, 상기 2개의 서열들은 동일한 길이를 갖는다.
- [0098] 2개의 서열들 사이의 % 상동성을 측정하기 위해 문헌(Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877)에서와 같이 변경된 문헌(Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268)의 알고리즘이 사용된다. 이러한 알고리즘은 문헌(Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 내로 도입된다. NBLAST 프로그램(점수=100, 단어길이=12)으로 BLAST 뉴클레오타이드 검색을 수행하여 본원에 기재되어 있거나 개시되어 있는 핵산 분자에 대한 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 수득한다. XBLAST 프로그램(점수 = 50, 단어길이 = 3)으로 BLAST 단백질 검색을 수행한다. 비교 목적으로 갭 정렬을 수득하기 위해, 갭 BLAST를 문헌(Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402)에 기재된 바와 같이 이용한다. BLAST 및 갭 BLAST 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램(예를 들면, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라미터를 이용한다. 추가 상세한 정보에 대해서는 국립 생물공학정보센터의 웹사이트(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 월드와이드 웹)를 참조한다. 본원에 기재된 방법에서 사용되기에 적합한 단백질은 본원에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열에 비해 1개 내지 15개의 아미노산 변화, 예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개 또는 15개의 아미노산 치환, 결실 또는 추가를 갖는 단백질도 포함한다. 다른 실시양태에서, 변경된 아미노산 서열은 본원에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열과 75% 이상, 예를 들면, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. 변경된 아미노산 서열이 본원에 기재된 조성물 및 방법에서 기능성을 나타내기에 충분한 생물학적 활성을 보유하는 한, 이러한 서열 변이체 단백질은 본원에 기재된 방법에 적합하다. 아미노산이 치환되는 경우, 치환은 보존적 아미노산 치환이어야 한다. 일반 아미노산들 중에서 예를 들면, "보존적 아미노산 치환"은 각각의 하기 군 내의 아미노산들 사이의 치환에 의해 예시된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판, (3) 세린 및 스레오닌, (4) 아스파르트레이트 및 글루타메이트, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 라이신, 아르기닌 및 히스티딘. 당업자는 일반적으로 폴리펩티드의 비필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경시키지 않는다는 것을 인식한다(예를 들면, 문헌(Watson et al. Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224) 참조). BLOSUM62 표는 500개 초과와 관련 단백질 군들의 고도로 보존된 영역들을 대표하는, 단백질 서열 절편들의 약 2,000개 국소 다중 정렬로부터 유도된 아미노산 치환 매트릭스이다(Henikoff et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:10915-10919). 따라서, BLOSUM62 치환 빈도는 일부 실시양태에서 본원에 기재되어 있거나 개시되어 있는 아미노산 서열 내로 도입되는 보존적 아미노산 치환을 정의하는 데에 사용된다. (상기 논의된 바와 같이) 화학적 성질만을 기초로 아미노산 치환을 디자인할 수 있지만, 어구 "보존적 아미노산 치환"은 바람직하게는 -1 초과와 BLOSUM62 값으로 표시되는 치환을 지칭한다. 예를 들면, 아미노산 치환은 이 치환이 0, 1, 2 또는 3의 BLOSUM62 값을 특징으로 하는 경우 보존적 치환이다. 이 시스템에 따르면, 바람직한 보존적 아미노산 치환은 1 이상(예를 들면, 1, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 하지만, 보다 바람직한 보존적 아미노산 치환은 2 이상(예를 들면, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 한다.

- [0099] 본원에서 사용된 바와 같이, 상응하는 잔기는 정렬된 좌위에 존재하는 잔기를 지칭한다. 관련된 또는 변이체 폴리펩티드는 당업자에게 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 정렬된다. 이러한 방법은 전형적으로 일치율을 최대화하고, 수동 정렬의 이용 및 당업자에게 공지되어 있는 이용가능한 다수의 정렬 프로그램(예를 들면, BLASTP) 등의 이용과 같은 방법을 포함한다. 당업자는 폴리펩티드들의 서열들을 정렬함으로써 보존된 동일한 아미노산 잔기를 지표로서 사용하여 상응하는 잔기를 확인할 수 있다. 상응하는 위치는 구조 정렬, 예를 들면, 단백질 구조의 컴퓨터 모의 정렬의 이용에 기초할 수도 있다. 다른 경우, 상응하는 영역이 확인될 수 있다.
- [0100] 본원에서 사용된 바와 같이, 대립형질 변이체 또는 대립형질 변이물은 유전자의 기준 형태와 상이한 유전자에 의해 코딩된(즉, 대립형질에 의해 코딩된) 폴리펩티드를 지칭한다. 전형적으로, 유전자의 기준 형태는 한 종의 집단 또는 단일 기준 구성원으로부터의 폴리펩티드의 야생형 형태 및/또는 우세한 형태를 코딩한다. 전형적으로, 종들 사이의 변이체를 포함하는 대립형질 변이체는 전형적으로 동일한 종으로부터의 야생형 및/또는 우세한 형태에 대한 80% 또는 90% 이상의 아미노산 동일성을 갖고; 동일성 정도는 유전자, 및 비교가 중간 비교인지 아니면 종내 비교인지에 의해 좌우된다. 일반적으로, 종내 대립형질 변이체는 폴리펩티드의 야생형 및/또는 우세한 형태에 대한 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 포함하는, 야생형 및/또는 우세한 형태에 대한 약 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0101] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "실질적으로 정제된"은 정제 전에 통상적으로 관심있는 성분과 함께 동반되거나 관심있는 성분과 상호작용하는 다른 성분들을 실질적으로 또는 본질적으로 함유하지 않을 수 있는 관심있는 성분을 지칭한다. 예를 들면, 관심있는 성분의 제제가 (건조 중량 기준으로) 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만의 오염 성분을 함유할 때 "실질적으로 정제된" 상태일 수 있다. 따라서, 관심있는 "실질적으로 정제된" 성분은 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99% 이상의 순도를 가질 수 있다.
- [0102] 본원에서 사용된 바와 같이, 종 변이체는 종들 사이의 동일한 폴리펩티드의 변이체를 지칭한다. 일반적으로, 종간 변이체는 폴리펩티드의 야생형 및/또는 우세한 형태에 대한 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 동일성을 포함하는, 또 다른 종으로부터의 야생형 및/또는 우세한 형태에 대한 약 60%, 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖는다.
- [0103] 본원에서 사용될 때, 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 객체인 동물을 지칭한다. 예를 들면, 대상체는 인간을 포함하나 이것으로 한정되지 않는 포유동물을 일 수 있으나 이것으로 한정되지 않는다.
- [0104] 본원에서 사용된 바와 같이, IC₅₀은 반응을 측정하는 분석에서 최대 반응의 50% 억제, 예컨대, BTK의 억제를 달성하는 특정 시험 화합물의 양, 농도 또는 용량을 지칭한다.
- [0105] 본원에서 사용된 바와 같이, EC₅₀은 특정 시험 화합물에 의해 유도된, 유발된 또는 증강된 특정 반응의 최대 발현의 50%에서 투여량 의존적 반응을 이끌어내는 특정 시험 화합물의 용량, 농도 또는 양을 지칭한다.
- [0106] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료하는" 또는 "치료", 및 다른 문법적 등가어는 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상의 완화, 경감 또는 호전; 질환 또는 질병의 하나 이상의 추가 증상의 출현, 중증도 또는 빈도의 호전, 예방 또는 감소; 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상의 근원적인 대사적 원인의 호전 또는 예방; 질환 또는 질병의 억제, 예를 들면, 질환 또는 질병의 발생의 정지; 질환 또는 질병의 경감; 질환 또는 질병의 퇴행 야기; 질환 또는 질병에 의해 야기된 질병의 경감; 또는 질환 또는 질병의 증상의 예방적 및/또는 치료적 억제를 포함한다. 비한정적 예에서, 예방 이익을 위해, 본원에 개시된 제3 세대 BTK 억제제 화합물이 특정 장애를 발생시킬 위험에 있는 개체, 특정 장애를 발생시킬 성향을 갖는 개체 또는 장애의 생리학적 증상들 중 하나 이상의 생리학적 증상을 호소하는 개체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제3 세대 BTK 억제제 화합물이 하나 이상의 치료제를 사용한 치료 후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 제3 세대 BTK 억제제 화합물은 하나 이상의 치료제를 사용한 치료와 함께 대상체에게 투여된다.
- [0107] 본원에서 사용된 바와 같이, 방지 또는 예방은 질환 또는 질병을 발생시킬 위험의 감소를 지칭한다.
- [0108] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량", "치료 유효량" 또는 "약학적 유효량"은 장애를 치료하기에 충분한 BTK 억제제 화합물의 양을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 결과는 장애의 징후, 증상 또는 원인의 감소 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 원하는 변경이다. 예를 들면, 치료적 용도를 위한 "유효량"은 장애의 임상적으로 유의한 감소를 제공하는 데에 요구되는, 본원에 개시된 BTK 억제제 화합물을 포함하는 조성물의 양이다. 임의의 개별 사례에서 적절한 "유효량"은 임의의 적합한 기법(예를 들면, 용량 상승 연구)을 이용함으

로써 결정된다.

[0109] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 본원에 기재된 BTK 억제제 화합물의 생물학적 활성 또는 성질을 제거하지 않고 상대적으로 무독성을 나타내는 물질(예를 들면, 담체 또는 희석제)을 지칭한다 (즉, 상기 물질은 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하지 않거나 그 자신이 함유되어 있는 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 개체에게 투여된다).

[0110] 본원에서 사용된 바와 같이, 대조군은 시험 파라미터로 처리되지 않는다는 점을 제외하고 시험 샘플과 실질적으로 동일한 샘플, 또는 샘플이 혈장 샘플인 경우 관심있는 질병에 의해 영향받지 않은 정상 지원자로부터 수득될 수 있는 샘플을 지칭한다.

[0111] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체", "개체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어들 중 어느 것도 의료 전문가(예를 들면, 의사, 간호사, 의사 보조자, 병원장, 호스피스 종사자)의 감독을 요구하는 것으로서 해석되어서는 안 된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 대상체는 포유동물(예를 들면, 인간 또는 비-인간 동물) 및 비-포유동물을 비롯한 임의의 동물일 수 있다. 본원에서 제공된 방법 및 조성물의 한 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0112] 본원에서 사용된 바와 같이, "접촉"은 닿는 행위, 접촉하는 행위, 또는 물질들을 바로 인접하게 위치시키는 행위를 지칭한다. "접촉"은 유체 또는 반유체 혼합물에서 성분들을 혼합시킴으로써 달성될 수 있다.

[0113] **개요: 암에서 BTK 기능 및 약물 내성**

[0114] 약물 내성은 감염성 질환 및 암을 비롯한 여러 의약 영역에 영향을 미치는 문제점이다. 암 치료 과정 동안 암세포 집단이 반복된 분열에 의해 확장될 때 자연발생적 무작위 돌연변이들(이들 중 일부는 내성 및 이로써 생존 이점을 부여함)이 발생한다. CLL을 갖는 환자를 비가역적 BTK 억제제 이브루티닙으로 치료하는 동안 발생하는 BTK 유전자의 돌연변이가 본원에 기재되어 있다. 이브루티닙을 사용한 대략 18개월의 치료 후, 분리된 연구들에서 3명의 환자들은 절대 림프구 수(ALC)의 상승 및 증가된 림프절 크기를 나타내었다. 이브루티닙 용량이 1명의 환자에서 하루에 560 mg부터 하루에 840 mg까지 상승되었을 때조차도 질환 진행이 계속되었다. 혈액 샘플을 환자로부터 분리하였고, BTK를 코딩하는 mRNA를 상기 샘플에 함유된 세포로부터 분석하였다. 2명의 환자들에서 BTK 단백질의 돌연변이가 출현하였다는 것이 발견되었다. 1명의 환자에서, BTK를 코딩하는 핵산은 사이토신(c)-1635로의 구아닌(g)-1635의 미스센스 돌연변이를 가짐으로써, 시스테인-481 코돈인 TGC가 TCC(세린)으로 치환되었다. 두 번째 환자에서, BTK를 코딩하는 핵산은 아데닌(a)-1634로의 티민(t)-1634의 미스센스 돌연변이를 가짐으로써, 시스테인-481 코돈인 TGC가 AGC(세린)로 치환되었다. 이브루티닙을 사용한 치료 초기에 동일한 환자들로부터 채취된 샘플은 이들 돌연변이들을 함유하지 않았다. Cys-481 코돈의 돌연변이는 이브루티닙 치료에 의해 공급된 선택적 압력에 대한 종양의 적응 반응을 암시한다.

[0115] 내성 돌연변이의 획득은 종양학에서 이마티닙(글리벡)을 비롯한 모든 주요 티로신 키나제 억제제들, 및 EGFR 억제제인 제피티닙 및 에를로티닙에 대해 기재되어 있다. 진행된 CML에서 이마티닙 사용 시 66%의 환자들이 재발하고, 5%의 만성 CML 환자들이 처음 5년 이내에 재발한다. 이들 재발된 환자들 중 30% 내지 50%의 환자들이 표적 키나제(ABL)에서 내성 돌연변이를 획득하였다. 이러한 환자들은 다사티닙, 닐로티닙 등을 비롯한 다른 치료제로 계속 치료받지만, 이들 중 대다수는 궁극적으로 새로운 내성 돌연변이에 의해 재발한다. 폐암에서, 에를로티닙 및 제피티닙은 인상적이고 지속적인 임상 결과를 발생시켰으나, 거의 전부가 내성으로 인해 12개월 내지 18개월 이내에 비효과적이게 된다. 이들 내성 환자들의 약 50%는 단일 아미노산을 변화시키는, T790M으로서 지칭되는 표적 키나제(EGFR)의 돌연변이를 갖는다.

[0116] 야생형 BTK의 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 아미노산 치환(C481S)을 함유하는 변경된 BTK 폴리펩티드 및 이 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 변경된 BTK 핵산 및 폴리펩티드를 제조하는 방법도 본원에 기재되어 있다. 본원에 기재된 변경된 BTK 핵산 및 폴리펩티드; 및 본원에 기재된 변경된 BTK 핵산 및 폴리펩티드의 검출을 위한 시약을 함유하는 조성물, 조합물 및 키트도 본원에 기재되어 있다. 제2세대 BTK 억제제를 비롯한 BTK 억제제를 비롯한 돌연변이체 BTK 상호작용 분자를 확인하기 위해 변경된 BTK 폴리펩티드를 사용하는 방법도 제공된다. 합성 핵산인 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. cDNA 분자인 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. 합성 핵산인 변경된 BTK 핵산에 의해 생성된 변경된 BTK 폴리펩티드도 본원에 기재되어 있다. cDNA 분자인 변경된 BTK 핵산에 의해 생성된 변경된 BTK 폴리펩티드도 본원에 기재되어 있다. BTK 게놈 DNA를 함유하지 않는 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. 비메틸화되어 있는 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. BTK 인트론 서열을 함유하지 않는 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. BTK

게놈 서열의 2개 이상의 엑손들로부터의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 변경된 BTK 핵산도 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 핵산은 야생형 BTK 폴리펩티드의 위치 481에 상응하는 위치에서 세린을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0117] BTK의 아미노산 위치 481에서의 돌연변이, 예를 들면, C481S의 확인은 하나 이상의 내성 돌연변이를 갖는 돌연변이체 BTK의 억제에 효과적인 억제제의 디자인 및 스크리닝을 가능하게 한다. 이러한 억제제는 임상 및 치료 적용에 유용하다. 일부 실시양태에서, 억제제는 암, 예를 들면, 혈액암, 예컨대, B 세포 악성종양의 치료에 유용하다.

[0118] 본원에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK의 아미노산 위치 481에서의 돌연변이, 예를 들면, C481S의 확인을 위해 스크리닝된다. 일부 실시양태에서, 이러한 돌연변이의 확인은 암 치료의 처방 또는 암 치료의 변경을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 이러한 돌연변이의 확인은 특정 치료, 예를 들면, 돌연변이체 C481S의 활성을 억제하는 억제제(즉, 제2 세대 BTK 억제제)를 사용한 치료를 위해 대상체를 분류하는 데에 이용된다. 일부 실시양태에서, 이러한 돌연변이의 확인은 BTK-매개된 질환 또는 질병, 예를 들면, 혈액암, 예컨대, B 세포 암의 높은 재발 위험을 갖는 것으로서 대상체를 특징짓는 데에 이용된다. 일부 실시양태에서, 이러한 돌연변이의 확인은 특정 BTK 억제제, 예를 들면, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제, 예컨대, 이브루티닙에 대한 반응성을 결여하는 것으로서 대상체를 특징짓는 데에 이용된다.

[0119] 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, BTK 억제제를 사용한 치료를 제공받는 환자에서 BCR 경로의 다운스트림 단백질의 별개 돌연변이도 확인되었다. 예를 들면, PLC γ 2 및 CARD11의 돌연변이가 확인되었다. PLC γ 2의 경우, R665 및 S707에서 아미노산 치환을 발생시키는 미스센스 돌연변이(예를 들면, R665W 및 S707F)가 발견되었다. CARD11의 경우, 위치 L232에서의 류신의 삽입(즉, L232LL)이 관찰되었다. 이러한 돌연변이는 각각의 단백질에 대한 항시적 활성을 초래할 것으로 예측된다. 따라서, 치료할 환자의 선택을 위해 이러한 돌연변이를 스크리닝하고 BTK 억제제 치료를 제공받는 환자를 모니터링하고 치료 요법, 예컨대, 유지 치료를 최적화하는 방법이 본원에서 제공된다.

[0120] 돌연변이 BTK 폴리펩티드

[0121] 돌연변이 BTK 폴리펩티드가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 단리된 돌연변이 BTK 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 단리된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 비천연 돌연변이 BTK 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 단리된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 재조합 돌연변이 BTK 폴리펩티드이다. 전형적으로, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 하나 이상의 BTK 활성을 나타낸다. 예를 들면, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 전형적으로 BTK 활성, 예를 들면, 표적 분자와의 회합 또는 표적 기질의 인산화(즉, 키나제 활성)를 보유한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK 폴리펩티드에 비해 상대적으로 감소된 키나제 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK 폴리펩티드에 비해 상대적으로 증가된 키나제 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK 폴리펩티드와 동등한 키나제 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 재조합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 숙주 세포로부터 정제된다.

[0122] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드의 키나제 활성을 억제한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK의 아미노산 위치 481에서 시스테인에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 이브루티닙인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다.

[0123] 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, BTK 활성을 갖는 단리된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체가 본원에서 제공되고, 이때 상기 변경은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 변경된 BTK 폴리펩티드 또는 변이체의 내성을 부여한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 아미노산 위치 481에서 아미노산의 치환 또

는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 아미노산 위치 481에서 아미노산의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 치환은 C481S이다. 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481의 결실을 포함한다.

[0125]

일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK에 비해 위치 481에서 아미노산의 치환을 포함하고, 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하고, 이때 위치 481의 아미노산은 시스테인이 아니다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 세린을 갖고 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0126]

일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에서의 변경 및 하나 이상의 추가 아미노산 위치에서의 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에서의 변경, 및 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 이상의 아미노산 위치에서의 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 위치 481에서의 변경 및 1개의 추가 아미노산 위치에서의 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에서 세린을 포함하고, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 이상의 추가 아미노산 위치에서 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 위치 481에서 세린을 포함하고, 1개의 추가 아미노산 위치에서 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서의 변경은 C481S인 치환이다.

[0127]

일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 부분은 BTK 폴리펩티드의 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 BTK 폴리펩티드의 키나제 도메인을 포함한다.

[0128]

일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 위치 481에서의 변경, 및 예를 들면, 하기 문헌들에 기재된 BTK 변경들로부터 선택된 변경을 포함한다: 문헌(Vihinen et al. (1999) Hum. Mutat. 13: 280-285); 문헌(de Weer et al. Hum. Mol. Genet. (1994) 3 (1): 161-166); 문헌(Perez de Diego et al. (2008) Clin Exp Immunol. 152(1):33-8); 문헌(Kenegane et al. (2000) Clin Exp Immunol. 120(3): 512-517); 문헌(Li et al. (1995) Immunity 2:451-460); 및 문헌(Baraldi et al. (1999) Structure 7:449-460). 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서의 변경은 C481S인 치환이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 변경은 아미노산 위치 L11, K12, S14, K19, F25, K27, R28, R33, Y39, Y40, E41, I61, V64, R82, Q103, V113, S115, T117, Q127, C154, C155, T184, P189, P190, Y223, W251, R288, L295, G302, R307, D308, V319, Y334, L358, Y361, H362, H364, N365, S366, L369, I370M, R372, L408, G414, Y418, I429, K430, E445, G462, Y476, M477, C502, C506, A508, M509, L512, L518, R520, D521, A523, R525, N526, V535, L542, R544, Y551, F559, R562, W563, E567, S578, W581, A582, F583, M587, E589, S592, G594, Y598, A607, G613, Y617, P619, A622, V626, M630, C633, R641, F644, L647, L652, V1065 및 A1185에서의 치환들로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 변경은 L11P, K12R, S14F, K19E, F25S, K27R, R28H, R28C, R28P, T33P, Y3S9, Y40C, Y40N, E41K, I61N, V64F, V64D, R82K, Q103QSFSSVR, V113D, S115F, T117P, Q127H, C154S, C155G, T184P, P189A, Y223F, W251L, R288W, R288Q, L295P, G302E, R307K, R307G, R307T, D308E, V319A, Y334S, L358F, Y361C, H362Q, H364P, N365Y, S366F, L369F, I370M, R372G, L408P, G414R, Y418H, I429N, K430E, E445D, G462D, G462V, Y476D, M477R, C502F, C502W, C506Y, C506R, A508D, M509I, M509V, L512P, L512Q, L518R, R520Q, D521G, D521H, D521N, A523E, R525G, R525P, R525Q, N526K, V535F, L542P, R544G, R544K, Y551F, F559S, R562W, R562P, W563L, E567K, S578Y, W581R, A582V, F583S, M587L, E589D, E589K, E589G, S592P, G594E, Y598C, A607D, G613D, Y617E, P619A, P619S, A622P, V626G, M630I, M630K, M630T, C633Y, R641C, F644L, F644S, L647P, L652P, V1065I 및

A1185V로부터 선택된다.

[0129] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 부분은 BTK 폴리펩티드의 활성을 나타낸다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 상기 부분은 키나제 활성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 BTK 폴리펩티드의 키나제 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 본질적으로 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 BTK 폴리펩티드의 키나제 도메인으로 구성된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 약 397부터 아미노산 위치 약 652까지 걸쳐 있는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 2에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 약 402부터 아미노산 위치 약 652까지 걸쳐 있는 아미노산 서열을 포함한다.

[0130] 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 이중 폴리펩티드에 연결된 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 BTK 폴리펩티드의 키나제 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서의 변경은 C481S인 아미노산 치환이다. 융합 단백질을 발생시키는 방법은 당분야에서 공지되어 있고 표준 재조합 DNA 기법을 포함한다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 상이한 폴리펩티드 서열들을 코딩하는 DNA 단편들은 통상적인 기법, 예를 들면, 라이게이션(ligation)을 위한 블런트(blunt) 말단 또는 스테거(stagger) 말단의 사용, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한효소 분해, 적절한 경우 코헤시브(cohesive) 말단의 충전, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파타제 처리, 및 효소적 라이게이션에 의해 인-프레임(in-frame)으로 함께 라이게이션된다. 일부 실시양태에서, 융합 유전자는 자동화된 DNA 합성기를 비롯한 통상적인 기법에 의해 합성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 단편의 PCR 증폭은 후속적으로 어닐링되고 재증폭되어 키메라 유전자 서열을 발생시킬 수 있는 2개의 연속 유전자 단편들 사이의 상보적인 오버행(overhang)을 발생시키는 고착제 프라이머를 사용함으로써 수행될 수 있다(예를 들면, 문헌(Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992) 참조). 일부 실시양태에서, 융합 모이어티(예를 들면, GST 폴리펩티드)를 코딩하는 발현 벡터가 상업적으로 입수가능하다. 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 융합 모이어티가 변경된 BTK 폴리펩티드에 인-프레임으로 연결되도록 이러한 발현 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 펩티드 태그에 연결된 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 태그는 태그 특이적 항체에 의해 인식되는 에피토프 태그이다. 일부 실시양태에서, 태그는 에피토프 태그, 예컨대, c-myc, V-5, 헤마글루티닌(HA) 또는 FLAG 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, 태그는 친화성 태그, 예컨대, 바이오틴, 스트랩-태그, 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 폴리(His) 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 검출가능한 단백질 또는 모이어티, 예컨대, 발광, 화학발광, 생체발광 또는 형광 단백질 또는 모이어티에 연결된 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 형광 단백질은 녹색(GFP), 적색(RFP), 시안(CFP), 황색(YFP), 또는 청색(BFP) 형광 단백질이다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드는 효소, 예를 들면, 루시퍼라제 또는 베타-갈락토시다제에 연결된 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 포함한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 포함하는 어레이가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 마이크로칩에 결합된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 마이크로칩에 직접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 연결체를 통해 마이크로칩에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩 어레이가 본원에서 제공된다.

[0133] **돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산**

[0134] 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 본원에 기재된 돌연변이 BTK 폴리펩티드들 중 임의의 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 특정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 유추하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고 표준 분자생물학 기법을 포함한다. 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 예시적인 핵산이 제공된다. 유전 코드의 축퇴성으로 인해 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 변이체 핵산들이 존재한다는 것이 이해된다. 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산

은 이러한 변이체들을 포괄한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 합성 핵산이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 cDNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 게놈 DNA를 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 메틸화되어 있지 않다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 BTK 게놈 인트론 서열을 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 BTK 폴리펩티드의 위치 481을 코딩하는 코돈 서열을 포함하는 핵산을 비롯한, BTK 게놈 서열의 2개 이상의 엑손들로부터의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 야생형 BTK 폴리펩티드의 위치 481에 상응하는 위치에서 세린을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0135]

일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 변형을 포함하고, 이때 코딩된 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 아미노산 시스테인의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 3에 기재된 핵산 서열(이때, 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 변경됨으로써, 상기 코돈이 시스테인을 코딩하지 않음), 또는 서열번호 3에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체(이때, 위치 481에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 시스테인을 코딩하지 않음)를 포함한다.

[0136]

일부 실시양태에서, 핵산 변경은 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 미스센스 돌연변이 또는 결실이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈을 변화시키는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈은 TGC 또는 TGT이다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈은 TGC이다. 일부 실시양태에서, BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈은 TGT이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈인 TGC를, 세린을 코딩하는 핵산 코돈으로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈인 TGT를, 세린을 코딩하는 핵산 코돈으로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 세린을 코딩하는 핵산 코돈은 TCT, TCC, TCA, TCG, AGT 및 AGC로부터 선택된다.

[0137]

일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 3에 기재된 핵산의 핵산 위치 1634에서 아데닌(a)으로의 티민(t)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈인 TGC를 AGC(세린)로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 7 또는 22에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0138]

일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 3에 기재된 핵산의 핵산 위치 1635에서 사이토신(c)으로의 구아닌(g)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 시스테인을 코딩하는 핵산 코돈인 TGC를 TCC(세린)로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 8 또는 23에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0139]

일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 7 또는 22에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하고, 이때 코딩된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK 폴리펩티드에 비해 상대적으로 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 8 또는 23에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하고, 이때 코딩된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 야생형 BTK 폴리펩티드에 비해 상대적으로 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 7 또는 22에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하고, 이때 코딩된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 시스테인을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호 8 또는 23에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하고, 이때 코딩된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 세린을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 서열번호

8 또는 23에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산에 대한 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하고, 이때 코딩된 돌연변이체 BTK는 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 세린을 포함한다.

[0140] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 단리된 핵산이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 DNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 cDNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 RNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 억제 RNA 분자(즉, RNAi)이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 핵산은 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 상보적이거나 결합하는 핵산 분자이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 아미노산 위치 481을 포함하는 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 부분을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 코돈은 시스테인이 아닌 아미노산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 코돈은 세린인 아미노산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 키나제 도메인을 코딩한다.

[0142] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 위치 481에서 시스테인이 아닌 아미노산을 코딩하는 핵산을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 본원에서 제공된 핵산은 아미노산 위치 481에서 세린을 코딩하는 핵산을 함유한다.

[0143] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 핵산은 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 핵산은 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산을 코딩하는 뉴클레오타이드 코돈을 함유하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 부분을 코딩하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 코돈은 시스테인이 아닌 아미노산을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 코돈은 세린인 아미노산을 코딩한다.

[0144] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 핵산은 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 핵산은 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 항시성 또는 유도성 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 벡터 또는 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 원핵세포 또는 진핵세포이다. 상기 숙주 세포에 의해 발현된 돌연변이 BTK 폴리펩티드도 본원에서 제공된다.

[0145] 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 바이러스 또는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터이다. 예시적인 바이러스 벡터는 백시니아, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 레트로바이러스 또는 헤르페스바이러스 벡터를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0146] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드들 중 임의의 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 어레이가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 마이크로칩에 결합된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 마이크로칩에 직접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 핵산은 연결체를 통해 마이크로칩에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드들 중 임의의 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩 어레이가 본원에서 제공된다.

[0147] **핵산 및 폴리펩티드의 제조**

[0148] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 표준 제조방법에 의해 발생된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 게놈 DNA로부터의 돌연변이체 BTK 서열의 증폭에 의해 발생된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 BTK 서열 특이적 프라이머를 사용한 증합효소 연쇄 반응에 의해 발생된다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 발현 벡터 내로 삽입되고 숙주 세포 또는 비-세포 추출물에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴

리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산 분자는 세포 또는 비-세포 추출물에서 코딩 폴리펩티드의 발현을 위한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 항시성 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다.

[0150] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자는 세포에 대한 "외생성" 핵산 분자인데, 이것은 상기 핵산 분자가 벡터를 도입한 세포에 대해 외래물질이거나, 서열이 세포 내의 서열에 대한 상동성을 나타내지만 숙주 세포 핵산 내에서 상기 서열이 통상적으로 발견되지 않는 위치에 존재한다는 것을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체(예를 들면, YAC)를 포함한다. 당업자는 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sambrook et al., 1989) 및 문헌(Ausubel et al., 1996)에 기재된 표준 재조합 기법을 통해 벡터를 구축할 준비가 잘 되어 있을 것이다.

[0151] 세포에서 단백질을 발현시키는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있고, 예를 들면, 세포, 예컨대, 동물 세포 및 식물 세포에서의 발현을 포함한다. 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 발현을 위한 예시적인 동물 세포는 세균, 효모, 곤충 세포, 양서류 및 포유동물 세포, 예컨대, 인간, 영장류, 설치류, 소 및 양 세포를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK를 코딩하는 핵산은 숙주 세포의 게놈 내로 삽입된다.

[0152] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 발현시키는 방법은 돌연변이 BTK 폴리펩티드가 세포에 의해 생성되도록 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 발현 벡터를 함유하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 방법들에서, 돌연변이체 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 신호 서열이 돌연변이 BTK 폴리펩티드와의 융합 펩티드로서 발현되도록 신호 서열을 코딩하는 핵산에 연결된다. 일부 실시양태에서, 신호 서열은 숙주 세포에 의한 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 분비를 가능하게 한다.

[0153] 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 이 돌연변이체 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 추출물은 숙주 세포로부터 제조되고, 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 정제 방법, 예컨대, BTK 폴리펩티드에 특이적이거나 특히 돌연변이 BTK 폴리펩티드에 특이적인 항체를 사용한 크로마토그래피 또는 면역친화성(그러나, 이들로 한정되지 않음)에 의해 단리된다.

[0154] **항체**

[0155] 아미노산 위치 481에서 변형을 갖는 변경된 BTK 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체로서, 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 야생형 BTK 폴리펩티드에 결합하지 않거나 보다 낮은 친화성으로 결합하는 항체가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스템인의 치환이다.

[0156] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 특이적으로 인식하되 야생형 BTK 폴리펩티드를 인식하지 않는 항체를 사용함으로써 검출된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 아미노산 위치 481에서 세린을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 특이적으로 인식하되 야생형 BTK 폴리펩티드를 인식하지 않는 항체를 사용함으로써 검출된다. 일부 실시양태에서, 항체는 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 하나 이상의 대립형질 형태에 대해 발생된다. 펩티드 또는 단백질 상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 이끌어내는 항원으로서 특정 단백질 또는 올리고펩티드를 사용하는 기법은 잘 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 표적 유전자의 원하는 대립형질 형태의 DNA 서열은 적절한 발현 벡터 내로의 삽입에 의해 클로닝되고 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 단백질로 번역된다. 상기 단백질은 회수되고 특이적 항체의 생성을 이끌어내기 위한 항원으로서 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 표적 유전자의 원하는 대립형질 형태의 DNA는 PCR 기술에 의해 증폭된 후, 시험관내에서 특이적 항체의 생성을 이끌어내는 항원으로서 사용될 단백질로 번역된다. 또 다른 실시양태에서, 대안적 대립형질의 DNA 서열이 특이적 항체의 생성을 이끌어내는 항원으로서 사용될 대립형질의 아미노산 서열을 나타내는 합성 펩티드의 발생을 위한 기초로서 사용된다.

[0157] 일부 실시양태에서, 항체는 표준 단일클론 항체 기법에 의해 발생되거나 재조합 기초 발현 시스템을 통해 발생된다. 일반적으로, 문헌(Abbas, Lichtman, and Pober, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Co. (1991))을 참조한다. 용어 "항체"는 온전한 항체 분자뿐만 아니라, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 단편 또는 유도체, 예컨대, Fab 및 F(ab')₂도 포함하기 위한 것이다. 이로써 생성된 항체는 항체를 생성하기 위한 항원으로서 사용된, 대립형질 형태로 생성된 돌연변이체 단백질에만 우선적으로 결합한다. 대립형질 특이적 항체를 발생시키는 방법도 전체 내용이 본원에 참고로 도입되는 미국 특허 제6,200,754호 및 제6,054,273호에 기재되어 있다.

[0158]

일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 항체는 인간화된 항체이다. "인간화된 항체"는 비-인간 공여자 면역글로불린으로부터 유래된 그의 CDR들을 갖는 조작된 항체의 일종을 지칭하고, 이때 분자의 남은 면역글로불린-유래된 부분은 하나 이상의 인간 면역글로불린(들)으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 골격 지지 잔기는 결합 친화성을 보존하도록 변경된다(예를 들면, 문헌(Queen et al. Proc. Natl. Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989)) 및 문헌(Hodgson et al. Bio/Technology, 9:421 (1991)) 참조). 일부 실시양태에서, 적합한 인간 수용자 항체는 공여자 항체의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열에 대한 상동성에 의해 통상적인 데이터베이스, 예를 들면, KABAT[®] 데이터베이스, 로스 알라모스(Los Alamos) 데이터베이스 및 스위스 단백질 데이터베이스로부터 선택된 인간 수용자 항체이다. 일부 실시양태에서, (아미노산을 기초로) 공여자 항체의 골격 영역에 대한 상동성을 특징으로 하는 인간 항체는 공여자 CDR들의 삽입을 위해 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 골격 영역을 제공하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 또는 가변 골격 영역을 공여할 수 있는 적합한 수용자 항체는 유사한 방식으로 선택된다. 일부 실시양태에서, 수용자 항체 중쇄 및 경쇄는 동일한 수용자 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 수용자 항체 중쇄 및 경쇄는 상이한 수용자 항체들로부터 유래된다. 종래 기술은 이러한 인간화된 항체의 여러 제조 방법을 기술한다(예를 들면, 유럽 특허출원 제EP-A-0239400호 및 제EP-A-054951호 참조).

[0159]

일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드에 특이적인 항체는 당분야에서 공지되어 있는 기법을 이용하여 샘플, 예를 들면, 분석 샘플, 세포 샘플, 세포 추출물, 생물학적 샘플 또는 환자 샘플에서 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 존재를 검출하는 데에 사용된다. 이들 기법들은 예를 들면, 웨스턴 블롯, 면역조직화학, 간접적인 면역형광 및 항체 마이크로어레이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체는 제2 세대 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체가 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 생물학적 활성을 억제하는 능력은 제2 세대 BTK 억제제를 확인하는, 본원에 기재된 방법을 이용함으로써 측정될 수 있다.

[0160]

돌연변이 BTK 폴리펩티드, 및 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 검출하는 진단 분석

[0161]

대상체에서 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 검출하는 단계 또는 대상체에서 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 검출하는 단계를 포함하는 진단 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK-매개된 질환 또는 질병을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 B 세포 암인 BTK-매개된 질환 또는 질병을 갖는다. 일부 실시양태에서, 상기 진단 방법은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내는 B 세포 암을 갖는 대상체의 스크리닝, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제로 치료될 대상체의 확인, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응할 가능성이 있거나 가능성이 없는 대상체의 확인, 대상체가 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 발생시킬 가능성이 있는지의 예측, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 제공받는 대상체의 치료의 모니터링, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제 치료를 제공받는 대상체의 치료의 최적화, 및 이들의 조합을 위해 이용된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 제2 세대 BTK 억제제로 치료될 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 돌연변이 BTK를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 변경은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 암세포의 내성을 부여한다.

[0162]

일부 실시양태에서, 검출된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출된 돌연변이 BTK 폴리펩티드는 서열번호 1에 기재된 야생형 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에 상응하는 위치에서 세린으로의 아미노산 시스테인의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 갖는 대상체는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 갖는 대상체는 이브루티닙인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 갖는 대상체는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 갖는 대상체는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 481에서 변경을 포함하는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 갖는 대상체는 이브루티닙인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타낸다.

[0163]

일부 실시양태에서, 대상체가 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나

타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0164]

일부 실시양태에서, 대상체에서 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 것으로서 BTK를 특징짓는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 것으로서 BTK를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0165]

일부 실시양태에서, 암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0166]

일부 실시양태에서, 암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응

하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0167] 일부 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제로 치료될 대상체를 선택하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 상기 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 제2 세대 BTK 억제제로 치료될 후보자로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서의 아미노산 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 결실을 포함한다.

[0169] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 cDNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플을 cDNA로 역전사하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 cDNA를 분석하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA), RNA(ctRNA) 또는 마이크로RNA를 함유하는 혈장 또는 혈청 샘플이다(예를 들면, 문헌(Chan et al. (2007) Br J Cancer. 96(5):681-5) 참조).

[0170] 일부 실시양태에서, 게놈 핵산 샘플은 핵산 증폭 방법에 의해 증폭된다. 일부 실시양태에서, 핵산 증폭 방법은 중합효소 연쇄 반응(PCR)이다. 일부 실시양태에서, 게놈 핵산 샘플은 BTK 유전자에 특이적인 뉴클레오타이드 프라이머 세트를 사용함으로써 증폭된다. 일부 실시양태에서, 상기 뉴클레오타이드 프라이머 세트는 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산 서열을 플랭킹한다. 일부 실시양태에서, 증폭 생성물은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산이다. 일부 실시양태에서, 서열 특이적 프라이머는 검출가능한 분자, 예컨대, 형광 표지, 생체발광 표지, 화학발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 제2 검출가능한 분자에 결합하는 펩티드 또는 분자에 접합된다.

[0171] 샘플에서 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 단일 점 돌연변이 및 BTK 폴리펩티드의 아미노산 변화를 검출하기 위해 다양한 방법들이 당분야에서 이용될 수 있다. 핵산 및 돌연변이체 폴리펩티드에서 돌연변이를 검

출하는 하기 방법들은 예시하기 위한 것이고 한정하기 위한 것이 아니다.

- [0172] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 핵산의 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481을 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용, 및 아미노산 위치 481을 함유하는 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산 서열의 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 서열 특이적 프라이머를 사용하여 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 PCR 단편을 벡터 내로 라이게이션시킨 후 아미노산 위치 481을 함유하는 BTK 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 벡터 서열 특이적 프라이머를 사용하여 벡터 내의 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.
- [0173] 본원에서 제공된 방법들에서 사용될 예시적인 서열결정 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있고, 디데옥시 또는 쇠 중결 방법, 막삼-길버트(Maxam-Gilbert) 서열결정, 대량 병렬 시그너처 서열결정(또는 MPSS), 폴로니(polony) 서열결정, 피로서열결정, 일루미나(Illumina) 염료 서열결정, SOLiD 서열결정(또는 라이게이션에 의한 서열결정), 철 반도체 서열결정, DNA 나노볼(nanoball) 서열결정, 헬리스코프(heliscopes) 서열결정, 및 단일 분자 실시간(SMRT) 서열결정을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0174] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 피로서열결정을 포함한다. 피로서열결정은 합성에 의한 서열 결정을 기초로 한다. 이것은 디데옥시뉴클레오타이드에 의한 쇠 중결보다는 오히려 뉴클레오타이드 도입 시 피로포스페이트 방출의 검출에 의존한다는 점에서 생거 서열결정과 상이하다. "합성에 의한 서열결정"은 서열결정될 단일 가닥 DNA를 수득한 후 그의 상보적 가닥을 효소로 합성하는 단계를 포함한다. 피로서열결정 방법은 또 다른 화학발광 효소를 사용한 DNA 중합효소(DNA 합성 효소) 활성의 검출을 기초로 한다. 상기 방법은 단일 가닥 DNA를 따라 상보적 가닥을 한번에 1개 염기씩씩 합성하고 각각의 단계에서 어느 염기가 실제로 추가되었는지를 검출함으로써 상기 단일 가닥 DNA의 서열결정을 가능하게 한다. 주형 DNA는 고정되어 있고, A, C, G 및 T 뉴클레오타이드의 용액들이 순차적으로 첨가되고 반응으로부터 제거된다. 뉴클레오타이드 용액이 주형의 짝지어지지 않은 첫 번째 염기를 보완할 때에만 광이 생성된다. 화학발광 신호를 생성하는 용액들의 순서는 주형의 서열의 결정을 가능하게 한다. 상기 방법은 혼합된 집단에서 다중-대립형질 돌연변이를 측정할 수 있으므로 백혈병 세포의 불균질한 집단에서 돌연변이를 검출할 수 있다.
- [0175] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 아미노산 위치 481에서 시스테인을 갖는 야생형 BTK를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 (a) 샘플을 돌연변이체 BTK 핵산 서열 특이적 올리고뉴클레오타이드 프로브와 접촉시킴으로써, 상기 돌연변이체 핵산 서열이 샘플에 존재하는 경우 프로브-DNA 복합체가 형성되는 것인 단계; 및 (b) 프로브-DNA 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 BTK 폴리펩티드의 아미노산 481에 상응하는 위치에서 세린을 코딩하는 핵산에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 핵산 특이적 프로브는 검출가능한 분자, 예컨대, 형광 표지, 생체발광 표지, 화학발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 제2 검출가능한 분자에 결합하는 펩티드 또는 분자에 접합된다.
- [0176] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 대립형질 특이적 PCR의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단일 뉴클레오타이드 변화는 돌연변이체 서열에서 제한 부위를 생성하는 PCR-기초 절단된 증폭된 다형성 서열(CAPS) 마커(Michaels et al (1998) Plant J. 14(3):381-5), 또는 검출가능한 모이어티, 예컨대, 형광단(그러나, 이것으로 한정되지 않음)에 부착된 서열 특이적 헤어핀 프로브(Mhlanga and Malmberg (2001) Methods 25:463-471)를 사용한 PCR에 의해 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열 특이적 프로브는 검출가능한 분자, 예컨대, 형광 표지, 생체발광 표지, 화학발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 제2 검출가능한 분자에 결합하는 펩티드 또는 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 프로브는 BTK 폴리펩티드의 아미노산 481에 상응하는 위치에서 세린을 코딩하는 핵산에 특이적이다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK를 코딩하는 DNA는 BEAMing(비드, 증폭, 에멀전, 자기) PCR 서열결정 방법에 의해 평가된다(예를 들면, 문헌(Li et al. (2006) Nat Methods. 3(2):95-7); 문헌(Li et al. (2006) Nat Methods. 3(7):551-9); 및 문헌(Diehl et al. (2008) Nat Med. 14(9): 985-990) 참조). BEAMing는 개별 DNA 분자가 유증수 에멀전 중의 자기 비드에 부착된 후 구획화된 PCR 증폭에 의해 증폭되는 기법이다. 그 다음, 비드에 결합된 DNA의 돌연변이 상태가 돌연변이체 또는 야생형 BTK에 대한 형광 대립형질 특이적 프로브와의 혼성

화에 의해 확인된다. 그 다음, 유동 세포측정(flow cytometry)이 혈장 또는 혈청에 존재하는 돌연변이체 DNA의 수준을 정량하는 데에 이용된다(예를 들면, 문헌(Higgins et al. (2012) Clin Cancer Res 18: 3462-3469) 참조).

[0178] 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 변성 고성능 액체 크로마토그래피(D-HPLC)를 포함한다. D-HPLC는 전해질 구배에 대한 전하 밀도에 따라 DNA 단편을 분리하도록 디자인된 카트리지 매트릭스 내에서 이중이중체/동중이중체 DNA 종의 시차 체류 동역학에 의존한다(예를 들면, 문헌(Frueh et al (2003) Clin Chem Lab Med. 41(4):452-61) 참조).

[0179] 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 아미노산 위치 시스테인 481에서 비가역적 BTK 억제제에 공유결합된 야생형 BTK 폴리펩티드와 비가역적 BTK 억제제에 공유결합하지 않는 돌연변이체 C481S BTK 폴리펩티드 사이의 pI 차이를 측정하기 위한 나노프로(NanoPro)의 사용을 비롯한 나노플루이드스(nanofluidics)를 포함한다. 나노프로는 등전점의 작은 차이를 기초로 단백질을 분리할 수 있는 기계이다. 비접합된 돌연변이체 BTK에 비해 비가역적 BTK 억제제를 사용한 시스테인 481의 공유변형은 그의 등전점을 변화시킬 것이고, 이것은 BTK에 결합하는 약물을 검출하는 데에 이용된다.

[0180] 일부 실시양태에서, 샘플의 시험은 마이크로어레이의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK를 코딩하는 DNA의 존재는 올리고뉴클레오타이드 어레이를 이용함으로써 평가된다(예를 들면, 문헌(Hastia et al. (1999) J Med Genet. 36(10):730-6) 참조). 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드 어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다. 일부 실시양태에서, 단일 뉴클레오타이드 변화는 마이크로칩을 이용함으로써 검출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 그의 부분을 코딩하는 핵산은 위치 481에서 시스테인이 아닌 아미노산을 코딩하는 핵산을 함유한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드 또는 그의 부분을 코딩하는 핵산은 아미노산 위치 481에서 세린을 코딩하는 핵산을 함유한다.

[0181] 상기 방법의 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK의 검출을 위한 샘플은 BTK 폴리펩티드를 함유하는 단백질 샘플이다. 이러한 예에서, 시험은 돌연변이 BTK 폴리펩티드에 특이적인 항체를 사용한 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 검출하는 방법은 대상체로부터 BTK 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 제공하는 단계, 및 돌연변이 BTK 폴리펩티드와의 결합에 특이적이고 야생형 BTK 폴리펩티드에 결합하지 않거나 감소된 친화성으로 결합하는 항체를 상기 샘플과 접촉시킴으로써 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 존재에 대해 상기 샘플을 시험하는 단계를 포함하고, 이때 돌연변이 BTK 폴리펩티드의 존재는 항체-돌연변이 BTK 폴리펩티드 복합체를 생성한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 항체-돌연변이 BTK 폴리펩티드 복합체를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 항체-돌연변이 BTK 폴리펩티드 복합체를 검출 시약으로 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 특이적 항체는 검출가능한 분자, 예컨대, 형광 표지, 생체발광 표지, 화학발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 제2 검출가능한 단백질(예를 들면, 이차 항체)에 결합하는 펩티드 또는 분자에 접합된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 특이적 항체의 결합은 검출가능한 분자에 대해 분석함으로써 검출된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 BTK 특이적 항체의 결합은 이차(예를 들면, 항-IgG) 항체를 사용함으로써 검출된다.

[0182] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK-매개된 질환 또는 장애를 갖는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 B 세포 증식 장애를 갖는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 중격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발렌트스트롬 마크로글로블린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 중격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.

[0183] 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 육종, 암종, 신경섬유종 또는 림프종을 갖는다.

[0184] 일부 실시양태에서, 대상체는 폐, 유방, 결장, 뇌, 전립선, 간, 췌장, 식도, 신장, 위, 갑상선, 방광, 자궁, 자궁경부 또는 난소의 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 전이성 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상

체는 급성 림프모세포성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 전구골수세포성 백혈병, 선암종, 선종, 부신암, 부신피질암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저세포암종, 담관암, 방광암, 골암, 골육종/악성 섬유 조직구종, 뇌간아교종, 뇌암, 암종, 소뇌 성상세포종, 뇌 성상세포종/악성 아교종, 뇌실막종, 수모세포종, 천막 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 또는 시상하부 아교종, 유방암, 기관지 선종/카르시노이드, 버킷 림프종, 카르시노이드 종양, 암종, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식 장애, 결장암, 피부 T 세포 림프종, 섬유조직형성 작은 둥근 세포 종양, 자궁내막암, 뇌실막종, 표피모양 암종, 식도암, 에워 육종, 두개의 생식세포 종양, 성선의 생식세포 종양, 간의 담관암, 안암/안내 흑색종, 안암/망막모세포종, 담낭암, 담석 종양, 위/복부암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 간질 종양, 거대세포 종양, 다형성아교모세포종, 아교종, 모발세포 종양, 두경부암, 심장암, 간세포/간암, 호지킨 림프종, 과다형성, 과다형성 각막 신경 종양, 제자리 암종, 하인두암, 장 신경절신경종, 췌도세포 종양, 카포시 육종, 신장/신장세포암, 후두암, 평활근종 종양, 입술구강암, 지질육종, 간암, 비-소세포폐암, 소세포폐암, 림프종, 마크로글로불린혈증, 악성 카르시노이드, 골의 악성 섬유 조직구종, 악성 고칼슘혈증, 악성 흑색종, 마르파노이드 체질(marfanoid habitus) 종양, 수질암종, 흑색종, 메르켈세포암종, 증피종, 전이성 피부암종, 전이성 편평모암, 구강암, 점막 신경종, 다발성 골수종, 균상식육종, 골수형성이상 증후군, 골수종, 골수증식 장애, 비강부비동암, 비인두암종, 목암, 신경조직암, 신경모세포종, 구강암, 구인두암, 골육종, 난소암, 난소 상피 종양, 난소 생식세포 종양, 췌장암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체성상세포종, 송과체배아종, 송과체모세포종, 뇌하수체 선종, 흉막폐장 모세포종, 진성적혈구증가증, 일차 뇌종양, 전립선암, 직장암, 신장세포 종양, 그물 세포 육종, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 고환종, 세자리 증후군, 피부암, 소장암, 연조직 육종, 편평세포암종, 편평모암종, 위암, 천막 원시 신경외배엽 종양, 고환암, 인후암, 흉선종, 갑상선암, 국소 피부 병변, 영양막 종양, 요도암, 자궁/자궁내막암, 자궁 육종, 질암, 음문암, 발텐스트롬 마크로글로불린혈증 또는 윌름스 종양인 암을 갖는다.

[0185] 일부 실시양태에서, 대상체는 재발된 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 불응성 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 불응성 암을 갖고, 이때 상기 암은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 불응성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 불응성 암을 갖고, 이때 상기 대상체는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 민감성의 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 불응성 암을 갖고, 이때 상기 대상체는 특정 용량의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 민감성의 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 불응성 암을 갖고, 이때 상기 대상체는 암의 하나 이상의 증상의 중증도 증가 또는 출현(즉, 질환 진행)을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암의 퇴행의 감소를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 암의 퇴행이 중단된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 재발된 또는 불응성 혈액암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 재발된 또는 불응성 B 세포 악성종양을 갖는다.

[0186] 일부 실시양태에서, 대상체는 혈액암을 갖는 것으로 의심되거나 혈액암을 가질 고위험에 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 B 세포 악성종양을 갖는 것으로 의심되거나 B 세포 악성종양을 가질 고위험에 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 백혈병, 림프종 또는 골수종을 갖는 것으로 의심되거나 가질 고위험에 있다.

[0187] 일부 실시양태에서, 대상체는 혈액암의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 B 세포 악성종양의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 백혈병, 림프종 또는 골수종의 하나 이상의 증상을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 증상, 예컨대, 비정상적인 B 세포 기능, 비정상적인 B 세포 크기 또는 형태, 비정상적인 B 세포 수, 피로, 발열, 야간 땀, 빈번한 감염, 확장된 림프절, 창백함, 빈혈, 용이한 출혈 또는 타박상, 식욕의 손실, 체중 손실, 골 또는 관절 통증, 두통 및 출혈점(그러나, 이들로 한정되지 않음)을 나타낸다.

[0188] 일부 실시양태에서, 대상체는 자가면역 질환, 예를 들면, 염증성 장 질환, 관절염, 루푸스, 류마티스성 관절염, 건선 관절염, 골관절염, 스틸병, 소아 관절염, 당뇨병, 중증근무력증, 하시모토 갑상선염, 오르드(Ord's) 갑상선염, 그레이브스병, 쇼그렌 증후군, 다발성 경화증, 켈랭-바레(Guillain-Barre) 증후군, 급성 파종성 뇌척수염, 에디슨병, 눈간대경련-간대성근경련 증후군, 강직 척추염, 항인지질 항체 증후군, 무형성 빈혈, 자가면역 간염, 복강 질환, 굿파스처 증후군, 특발성 혈소판감소자색반병, 시신경염, 피부경화증, 일차 담관간경화증, 레이터 증후군, 다카야수 동맥염, 측두 동맥염, 온난 자가면역 용혈성 빈혈, 베제너 육아종증, 건선, 전신 탈모증, 베체트병, 만성 피로, 자율신경기능이상, 자궁내막증, 간질성 방광염, 신경근긴장증, 피부경화증 또는 위염부통을 앓고 있다.

[0189] 다른 실시양태에서, 대상체는 이종면역 질병 또는 질환, 예를 들면, 이식편 대 숙주 질환, 이식, 수혈, 아나필

락시스, 알레르기, I형 과민성, 알레르기성 결막염, 알레르기성 비염 또는 아토피성 피부염을 앓고 있다.

[0190] 일부 실시양태에서, 대상체는 염증성 질환, 예를 들면, 천식, 충수염, 안검염, 세기관지염, 기관지염, 유행성 이하선염, 자궁경부염, 담관염, 담낭염, 결장염, 각막염, 방광염, 누선염, 피부염, 피부근육염, 뇌염, 심내막염, 자궁내막염, 장염, 장결장염, 상과염, 부고환염, 근막염, 섬유조직염, 위염, 위장염, 간염, 화농성염, 후두염, 유방염, 수막염, 척수염, 심근염, 근염, 신장염, 난소염, 고환염, 골염, 중이염, 췌장염, 이하선염, 심장막염, 복막염, 인두염, 흉막염, 정맥염, 간질폐렴, 폐렴, 직장염, 전립선염, 신우신염, 비염, 자궁관염, 동염, 위염, 유행성 이하선염, 건염, 편도염, 포도막염, 질염, 혈관염 또는 음문염을 갖는다.

[0191] 추가 실시양태에서, 대상체는 혈전색전성 장애, 예를 들면, 심근경색, 협심증, 혈관성형술 후 재폐색, 혈관성형술 후 재협착, 관상동맥우회술 후 재폐색, 관상동맥우회술 후 재협착, 뇌졸중, 일과성 허혈, 말초 동맥 폐색성 장애, 폐 색전증 또는 심부정맥 혈전증을 앓고 있다.

[0192] 일부 실시양태에서, 대상체는 질환 또는 질병의 치료를 위해 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환 또는 질병의 치료를 위해 BTK 억제제를 투여받거나 투여받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 질환 또는 질병의 치료를 위해 BTK 억제제 이외에 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받았다.

[0193] 일부 실시양태에서, 대상체는 암의 치료를 위한 하나 이상의 화학치료제를 투여받거나 투여받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암의 치료를 위해 BTK 억제제를 투여받거나 투여받았다. 일부 실시양태에서, 대상체는 암의 치료를 위해 BTK 억제제 이외에 하나 이상의 화학치료제를 투여받거나 투여받았다.

[0194] 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 유기체로부터의 임의의 조직 또는 체액으로부터 획득된다. 샘플은 전혈, 해리된 골수, 골수 흡인물, 흉막액, 복막액, 중추 척수액, 복부액, 췌장액, 뇌척수액, 뇌액, 복수, 심낭액, 소변, 침, 기관지 세척액, 땀, 눈물, 귀 유출물, 객담, 음낭수종액, 정액, 질 유출물, 모유, 양수, 및 호흡관, 장관 또는 비뇨생식관의 분비물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 샘플은 중앙 생검 샘플이다. 특정 실시양태에서, 샘플은 림프 시스템 또는 순환 시스템의 일부이거나 림프 시스템 또는 순환 시스템과 관련되어 있는 체액 또는 조직으로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 정맥, 동맥, 말초, 조직 또는 땀줄 혈액 샘플인 혈액 샘플이다. 특정 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를 함유하는 혈액 세포 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 순환 중앙 세포(CTC)를 함유한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 파종 중앙 세포(DTC)를 함유한다(예를 들면, 골수 흡인물 샘플 중의 DTC).

[0195] 조직 또는 체액 샘플에 함유된 세포로부터 핵산 및 단백질을 분리하는 방법은 당분야에서 잘 공지되어 있다. 특정 실시양태에서, 대상체로부터 획득된 샘플은 대상체로부터의 중앙 생검에 함유된 세포로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 대상체로부터 획득된 샘플은 골수 흡인물 중의 세포로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 대상체로부터 획득된 샘플은 혈청 샘플에 함유된 세포로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 대상체로부터 획득된 샘플은 림프 샘플에 함유된 세포로부터 분리된다. 특정 실시양태에서, 샘플은 세포에 함유되지 않은 순환 중앙 핵산을 함유한다.

[0196] 일부 실시양태에서, 샘플은 잘 공지되어 있는 관용적 임상 방법을 이용하여 샘플을 획득하는 임의의 적합한 수단에 의해 대상체로부터 획득된다. 대상체로부터 체액 샘플을 획득하는 절차는 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 전혈 및 림프로부터 채취하고 프로세싱하는 절차는 잘 공지되어 있고 제공된 방법들에서 사용될 샘플을 획득하는 데에 이용될 수 있다. 전형적으로, 혈액 샘플을 채취하는 경우, 혈액의 응고를 방지하기 위해 항-응고제(예를 들면, EDTA, 또는 시트레이트 및 헤파린 또는 CPD(시트레이트, 포스페이트, 텍스트로스) 또는 필적할만한 물질)가 샘플에 첨가된다. 일부 예에서, 혈액 샘플은 혈액 샘플의 응고를 방지하기 위해 일정량의 EDTA를 함유하는 채취 튜브 내에 채취된다.

[0197] 일부 실시양태에서, 샘플은 조직 생검이고, 예를 들면, 바늘 생검, CT-안내된 바늘 생검, 흡입 생검, 내시경 생검, 기관지경 생검, 기관지 세척, 절개 생검, 절제 생검, 펀치 생검, 면도 생검, 피부 생검, 골수 생검 및 고리 전기절제술(LEEP)에 의해 획득된다. 전형적으로, 100 mg 초과, 500 mg 이하의 양이 되, 더 작은 양, 예컨대, 100 mg 미만, 50 mg 이하, 10 mg 이하 또는 5 mg 이하일 수 있는 양; 또는 보다 큰 양, 예컨대, 100 mg 초과, 200 mg 이상, 500 mg 이상, 1 gm 이상, 2 gm 이상, 3 gm 이상, 4 gm 이상 또는 5 gm 이상의 양으로 비-괴사성 멸균 생검 또는 표본이 획득된다. 분석을 위해 추출될 샘플 크기는 수행되는 분석의 수, 조직 샘플의 건강, 암의 종류 및 환자의 상태를 포함하나 이들로 한정되지 않는 다수의 인자들에 의해 좌우된다. 일부 실시양태에서, 조직은 멸균 용기,

에컨대, 멸균 튜브 또는 배양 플레이트 내에 놓여지고, 임의적으로 적절한 배지에 침지된다. 전형적으로, 세포는 당분야에서 잘 공지되어 있는 바와 같이 기계적 수단 및/또는 효소적 처리에 의해 세포 현탁액으로 해리된다. 전형적으로, 세포는 채취된 후 분석을 위해 표준 핵산 단리 절차로 처리된다.

[0198] 일부 실시양태에서, 대상체로부터의 샘플의 채취는 규칙적인 간격으로, 예를 들면, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 매일, 매주, 2개월마다, 분기별, 2년마다 또는 매년 수행된다.

[0199] 일부 실시양태에서, 샘플의 채취는 하나 이상의 항암제를 사용한 치료를 기준으로 예정된 시간에서 또는 규칙적인 간격으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 항암제는 백혈병, 림프종 또는 골수종의 치료를 위해 투여된다. 백혈병, 림프종 또는 골수종의 치료를 위한 예시적인 항암제는 하기 항암제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 아드리아마이신(adriamycin)(독소루비신(doxorubicin)), 벅사르(bexsar), 벤다무스틴(bendamustine), 블레오마이신(bleomycin), 블레녹산(blenoxane), 보르테조밍(bortezomib), 다카바진(dacarbazine), 델타손(deltasone), 시스플라틴(cisplatin), 사이클로포스프아미드(cyclophosphamide), 사이토산(cytosan), DTIC 다카바진, 다사티닙, 독소루비신, 에토포사이드(etoposide), 플루다라빈(fludarabine), 그라니세트론(granisetrone), 키트릴(kytril), 레날리도마이드(lenalidomide), 마툴란(matulane), 메클로레타민(mechlorethamine), 무스타젠(mustargen), 무스틴(mustine), 나툴란(natulan), 리툭산(Rituxan)(리툭시맵(rituximab), 항-CD20 항체), VCR, 네오사르(neosar), 질소 머스타드, 온코빈(ovonin), 온단세트론(ondansetron), 오라손(orason), 프레드니손(prednisone), 프로카바진(procarbazine), 탈리도마이드(thalidomide), VP-16, 벨반(velban), 벨베(velbe), 벨사르(velsar), 베페시드(VePesid), 빈블라스틴(vinblastine), 빈크리스틴(vincristine), 제발린(Zevalin)[®], 조프란(zofran), 줄기 세포 이식, 방사선 치료 또는 조합 치료, 예컨대, ABVD(아드리아마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴 및 다카바진), ChlvPP(클로람부실(chlorambucil), 빈블라스틴, 프로카바진 및 프레드니솔론), 스탠포드(Stanford) V(무스틴(mustine), 독소루비신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 블레오마이신, 에토포사이드 및 스테로이드), BEACOPP(블레오마이신, 에토포사이드, 독소루비신, 사이클로포스프아미드, 빈크리스틴, 프로카바진 및 프레드니솔론), BEAM(카무스틴(carmustine)(BiCNU) 에토포사이드, 사이타라빈(cytarabine)(Ara-C, 사이토신 아라비노사이드(cytosine arabinoside)) 및 멜팔란(melphalan)), CHOP(사이클로포스프아미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손), R-CHOP(리툭시맵, 독소루비신, 사이클로포스프아미드, 빈크리스틴 및 프레드니손), EPOCH(에토포사이드, 빈크리스틴, 독소루비신, 사이클로포스프아미드 및 프레드니손), CVP(사이클로포스프아미드, 빈크리스틴 및 프레드니손), ICE(이포스파미드(ifosfamide)-카보플라틴-에토포사이드), R-ACVBP(리툭시맵, 독소루비신, 사이클로포스프아미드, 빈데신, 블레오마이신 및 프레드니손), DHAP(덱사메타손, 고용량 사이타라빈(Ara C), 시스플라틴), R-DHAP(리툭시맵, 덱사메타손, 고용량 사이타라빈(Ara C), 시스플라틴), ESHAP(에토포사이드(VP-16), 메틸-프레드니솔론 및 고용량 사이타라빈(Ara C), 시스플라틴), CDE(사이클로포스프아미드, 독소루비신 및 에토포사이드), 벨케이드(Velcade)[®](보르테조밍) + 독실(Doxil)[®](리포좀 독소루비신), 레블리마이드(Revlimid)[®](레날리도마이드) + 덱사메타손, 및 보르테조밍 + 덱사메타손. 일부 실시양태에서, 항암제는 플루다라빈이다. 일부 실시양태에서, 항암제는 벤다무스틴이다. 일부 실시양태에서, 항암제는 리툭산이다. 일부 실시양태에서, 항암제는 다사티닙이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 항암제를 사용한 치료 전, 동안 또는 후에, 또는 항암제를 사용한 연속적인 치료들 사이에 예정된 시간에서 또는 규칙적인 간격으로 채취된다. 구체적인 예에서, 샘플은 항암 치료제의 투여 전에 대상체로부터 획득된 후, 치료가 수행된 후 규칙적인 간격으로 대상체로부터 다시 획득된다.

[0200] 일부 실시양태에서, 샘플의 채취는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 기준으로 예정된 시간에서 또는 규칙적인 간격으로 수행된다. 예를 들면, 샘플은 치료 전, 동안 또는 후에, 또는 연속적인 치료들 사이에 예정된 시간에서 또는 규칙적인 간격으로 채취된다. 구체적인 예에서, 샘플은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제의 투여 전에 대상체로부터 획득된 후, 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료가 수행된 후 규칙적인 간격으로 대상체로부터 다시 획득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제 및 하나 이상의 추가 항암제를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제, 및 비가역적 BTK 억제제가 아닌 하나 이상의 추가 항암제를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 비가역적 BTK 억제제를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 하나 이상의 비가역적 BTK 억제제를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37이다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0201]

본원에서 제공된 방법들 중 임의의 방법에서 사용될 추가 BTK 억제제는 예를 들면, 미국 특허 제7,547,689호, 미국 특허 제7,960,396호, 미국 특허출원 공보 제2009-0197853 A1호 및 미국 특허출원 공보 제2012-0065201 A1호(이들 모두가 온전히 그대로 참고로 도입됨)에서 발견될 수 있다. 본원에서 제공된 방법들 중 임의의 방법에서 사용될 추가 BTK 억제제는 예를 들면, 하기 특허 문헌들에서도 발견될 수 있다: 미국 특허출원 공보 제2010-0029610호, 국제 특허출원 공보 제W009051822호, 국제 특허출원 공보 제W010123870호, 국제 특허출원 공보 제W009158571호, 국제 특허출원 공보 제W011034907호, 국제 특허출원 공보 제W012021444호, 국제 특허출원 공보 제W011029046호, 국제 특허출원 공보 제W008110624, 국제 특허출원 공보 제W010080481호, 국제 특허출원 공보 제W010144647호, 국제 특허출원 공보 제W010056875호, 국제 특허출원 공보 제W005047290호, 국제 특허출원 공보 제W006053121호, 국제 특허출원 공보 제W006099075호, 국제 특허출원 공보 제W008033834호, 국제 특허출원 공보 제W008033857호, 국제 특허출원 공보 제W008033858호, 국제 특허출원 공보 제W009137596호, 국제 특허출원 공보 제W010056875호, 국제 특허출원 공보 제W010068788호, 국제 특허출원 공보 제W010068806호, 국제 특허출원 공보 제W010068810호, 국제 특허출원 공보 제W011140488호, 국제 특허출원 공보 제W012030990호, 국제 특허출원 공보 제W012031004호, 국제 특허출원 공보 제W02010056875호, 국제 특허출원 공보 제W005066156호, 국제 특허출원 공보 제W010056875호, 미국 특허출원 공보 제2012-0316148호, 국제 특허출원 공보 제W009048307호, 국제 특허출원 공보 제W009147190호, 국제 특허출원 공보 제W011162515호, 국제 특허출원 공보 제W011162515호, 국제 특허출원 공보 제W006036941호, 국제 특허출원 공보 제W010126960호, 국제 특허출원 공보 제W007136790호, 국제 특허출원 공보 제W012025186호, 국제 특허출원 공보 제W02013010380호, 국제 특허출원 공보 제W02013010868호, 국제 특허출원 공보 제W02013010869호, 국제 특허출원 공보 제W02013008095호, 국제 특허출원 공보 제W011152351호, 국제 특허출원 공보 제W02013060098호, 국제 특허출원 공보 제W02013060098호, 국제 특허출원 공보 제W007002325호, 국제 특허출원 공보 제W007002433호, 국제 특허출원 공보 제W007013896호, 국제 특허출원 공보 제W009143024호, 국제 특허출원 공보 제W010065898호, 국제 특허출원 공보 제W02012158764호, 국제 특허출원 공보 제W02012158785호, 국제 특허출원 공보 제W02012158795호, 국제 특허출원 공보 제W02012158810호, 국제 특허출원 공보 제W009053269호, 국제 특허출원 공보 제W009156284호, 국제 특허출원 공보 제W02012020008호, 국제 특허출원 공보 제W02012156334호, 국제 특허출원 공보 제W02013024078호, 국제 특허출원 공보 제W008057252호, 국제 특허출원 공보 제W003081210호, 국제 특허출원 공보 제W003087051호, 미국 특허출원 공보 제2013-0059847A1호, 국제 특허출원 공보 제W006065946호, 국제 특허출원 공보 제W007027594호 및 국제 특허출원 공보 제W008092199호(이들 모두 온전히 그대로 참고로 도입됨).

[0202]

일부 실시양태에서, 대상체는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 하나 이상의 가역적 BTK 억제제와 함께 투여받는다. 예를 들면, 일부 실시양태에서, 대상체는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를, 결합을 위해 시스테인 481에 의존하지 않는 하나 이상의 가역적 BTK 억제제와 함께 투여받는다. 가역적 BTK 억제제는 당분야에서 공지되어 있고, 다사티닙, PC-005, RN486, PCI-29732 또는 테레산을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 특정 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제 이브루티닙은 가역적 BTK 억제제 다사티닙과 함께 투여된다.

[0203]

일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월, 24개월, 26개월, 28개월, 30개월, 32개월, 34개월, 36개월 또는 이보다 긴 기간 후에 수득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제에 노출된 경험이 없는 대상체에게 비가역적 BTK 억제제를 최초로 투여한 다음 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월, 24개월, 26개월, 28개월, 30개월, 32개월, 34개월, 36개월 또는 이보다 긴 기간 후에 수득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 재발된 또는 불응성 암을 갖는 대상체에게 비가역적 BTK 억제제를 최초로 투여한 다음 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월, 24개월, 26개월, 28개월, 30개월, 32개월, 34개월, 36개월 또는 이보다 긴 기간 후에 수득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 이상 수득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비가역적 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.

[0204]

유지 치료

[0205]

B 세포 증식 장애를 갖는 대상체의 유지 치료 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, B 세포 증식 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 유지 치료 방법은 초기 치료 기간 동안

혈액암을 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제로 치료한 후, 유지 치료 요법을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유지 치료 방법은 6개월 이상의 기간, 예를 들면, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 18개월, 19개월, 20개월, 21개월, 22개월, 23개월, 24개월, 25개월, 26개월, 27개월, 28개월, 29개월, 30개월, 31개월, 32개월, 33개월, 34개월, 35개월, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년 또는 이보다 더 긴 기간 동안 혈액암을 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용하여 치료하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0206]

예시적인 방법에서, 혈액암을 갖는 대상체는 치료 유효량의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제로 치료받고, 상기 대상체는 이 대상체가 BTK의 시스테인 481에서 변형을 초래하는, BTK를 코딩하는 내생성 유전자의 돌연변이를 획득하는지를 확인하기 위해 예정된 시간 간격으로 모니터링된다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형은 C481S이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 암세포 또는 ctDNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체가 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 전에 또는 초기에 야생형 BTK를 발현하는지를 확인하기 위해 하나 이상의 암세포 또는 ctDNA를 함유하는 샘플이 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 전에 또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 초기에(예를 들면, 약 1주 내지 약 2개월 후에) 상기 대상체로부터 수득된다.

[0207]

일부 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a)치료 유효 용량의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 상기 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 대상체가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 초래하는, BTK를 코딩하는 내생성 유전자의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 상기 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 상기 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형은 C481S이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 하나 이상의 암세포 또는 ctDNA를 함유한다. 일부 실시양태에서, 대상체가 야생형 BTK를 발현하는지를 확인하기 위해 하나 이상의 암세포 또는 ctDNA를 함유하는 샘플이 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 전에 또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료 초기에(예를 들면, 약 1주 내지 약 2개월 후에) 상기 대상체로부터 수득된다.

[0208]

일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0209]

일부 실시양태에서, 돌연변이는 BTK의 시스테인 481을 코딩하는 코돈 내의 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 아미노산 위치 481에서 시스테인을 또 다른 아미노산으로 치환시키는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 아미노산 위치 481에서 시스테인을 세린으로 치환시키는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 시스테인-481 코돈인 TGC를 TCC(세린)로 치환시키는 사이토신-1635로의 구아닌-1635의 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 시스테인-481 코돈인 TGC를 AGC(세린)로 치환시키는 아데닌(a)-1634로의 티민(t)-1634의 미스센스 돌연변이이다.

[0210]

일부 실시양태에서, 대상체가 BTK 폴리펩티드의 시스테인 481에서 변형을 초래하는, BTK를 코딩하는 내생성 유전자의 돌연변이를 획득하는지를 확인하기 위해 대상체를 1개월마다, 2개월마다, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다, 7개월마다, 8개월마다, 9개월마다, 10개월마다, 11개월마다 또는 1년마다 모니터링한다.

[0211]

일부 실시양태에서, 혈액암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미

만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 종격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 종격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL)이다.

[0212]

일부 실시양태에서, 유지 치료는 다수의 투여 주기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여 주기는 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월 또는 이보다 긴 기간이다. 일부 실시양태에서, 투여 주기는 이 주기에 걸쳐 단회 치료 용량의 비가역적 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여 주기는 이 주기에 걸쳐 2회 이상의 상이한 용량의 비가역적 BTK 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 용량은 연속 주기에 걸쳐 상이하다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 용량은 연속 주기에 걸쳐 증가한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 용량은 연속 주기에 걸쳐 동일하다.

[0213]

일부 실시양태에서, 유지 치료는 1일 용량의 비가역적 BTK 억제제의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여되는 비가역적 BTK 억제제의 1일 용량은 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 예를 들면, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 예를 들면, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 예를 들면, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 예를 들면, 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 유지 용량은 하루에 약 840 mg이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 억제제가 이브루티닙인 경우, 유지 용량은 하루에 약 840 mg의 이브루티닙이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 유지 용량은 하루에 약 560 mg이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 억제제가 이브루티닙인 경우, 유지 용량은 하루에 약 560 mg의 이브루티닙이다. 특정 실시양태에서, 유지 용량은 하루에 약 420 mg이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 억제제가 이브루티닙인 경우, 유지 용량은 하루에 약 420 mg의 이브루티닙이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 유지 용량은 하루에 약 140 mg이다. 특정 실시양태에서, 비가역적 억제제가 이브루티닙인 경우, 유지 용량은 하루에 약 140 mg의 이브루티닙이다.

[0214]

일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 이보다 더 높은 빈도로 투여된다. 특정 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 1일 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙인 비가역적 BTK 억제제는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 이보다 더 높은 빈도로 투여된다. 특정 실시양태에서, 이브루티닙인 비가역적 BTK 억제제는 1일 1회 투여된다.

[0215]

일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 용량은 시간에 따라 상승된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙인 비가역적 BTK 억제제의 용량은 시간에 따라 상승된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 용량은 예정된 기간에 걸쳐 약 1.25 mg/kg/일부터 약 12.5 mg/kg/일까지 상승된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙인 비가역적 BTK 억제제의 용량은 예정된 기간에 걸쳐 약 1.25 mg/kg/일부터 약 12.5 mg/kg/일까지 상승된다. 일부 실시양태에서, 예정된 기간은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 18개월, 24개월 또는 이보다 긴 기간이다.

[0216]

일부 실시양태에서, 투여 주기는 추가 치료제와 함께 비가역적 BTK 억제제의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 비가역적 BTK 억제제와 동시에, 순차적으로 또는 간헐적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 항암제이다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 백혈병, 림프종 또는 골수종의 치료를 위한 항암제이다. 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제와 함께 투여될 예시적인 항암제는 본원의 임의의 부분에서 제공된다. 특정 실시양태에서, 항암제는 항-CD20 항체(예를 들면, 리툭산)이다. 특정 실시양태에서, 항암제는 벤다무스틴이다. 일부 실시양태에서, 추가 항암제는 가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가 항암제는 BTK와의 결합을 위해 시스테인 481에 의존하지 않는 가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가 항암제는 다사티닙이다.

[0217]

일부 실시양태에서, 혈액암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 유지 치료를 제공받는 대상체가 상기 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플

을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변형을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 상기 방법의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 혈액암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0218]

일부 실시양태에서, 혈액암의 치료를 위해 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 유지 치료를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 BTK 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변형을 갖는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변형을 갖지 않는 경우 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 대상체가 상기 변형을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 C481에 결합하지 않는 공유 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 가역적 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (a)는 생체외에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 혈액암은 B 세포 악성종양이다. 예시적인 B 세포 악성종양이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다.

[0219]

돌연변이체 BTK와 상호작용하는 분자의 확인

[0220]

돌연변이 BTK 폴리펩티드와 상호작용하는 물질을 스크리닝하기 위해 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 사용하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 BTK 폴리펩티드와 상호작용하는 물질도 돌연변이체 BTK를 억제한다. 따라서, 돌연변이체 BTK를 억제하는 물질(즉, 제2 세대 BTK 억제제)을 스크리닝하기 위해 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 사용하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들은 B 세포 암의 치료를 위한 제2 세대 BTK 억제제의 확인을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제, 예를 들면, 이브루티닙을 사용한 치료에 대한 내성을 나타내는 내성 암, 예컨대, B 세포 암의 치료를 위한 제2 세대 BTK 억제제의 확인을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 제공된 상기 방법들을 이용하여 확인한 제2 세대 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드도 억제한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 상기 방법들을 이용하여 확인한 제2 세대 BTK 억제제는 돌연변이 BTK 폴리펩티드 및 야생형 BTK 폴리펩티드를 억제한다. 일부 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드의 활성을 억제하지 않는다.

[0221]

일부 실시양태에서, 제2 세대 BTK 억제제를 확인하는 방법은 (a) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 제공하는 단계; (b) 상기 변경된 BTK를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 (c) BTK 활성의 수준을 검출하는 단계로서, 이때 활성의 감소는 상기 화합물이 상기 변경된 BTK를 억제한다는 것을 표시하는 것인 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 BTK 활성의 수준을 검출하기 전에 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간 또는 이보다 긴 시간 동안 시험 화합물과 접촉된다.

[0222]

일부 실시양태에서, BTK에서의 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서의 아미노산 치환 또는 결실이다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로의 시스템인의

치환이다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린, 메티오닌 및 쓰레오닌으로부터 선택된 아미노산으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 방법들을 이용하여 확인한 제2 세대 BTK 억제제는 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 변경을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 억제한다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법들을 이용하여 확인한 제2 세대 BTK 억제제는 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린을 갖는 돌연변이 BTK 폴리펩티드를 억제한다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법들을 이용하여 확인한 제2 세대 BTK 억제제는 야생형 BTK 폴리펩티드도 억제한다.

[0223]

일부 실시양태에서, BTK 활성의 수준의 검출은 시험관내 키나제 분석에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 키나제 분석에서 사용된 기질은 PLC γ 이다. 일부 실시양태에서, 키나제 분석에서 사용된 기질은 펩티드 기질이다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK가 특정 비가역적 억제제, 예컨대, 이브루티닙을 사용한 억제에 대한 내성을 나타내는 경우, 상기 억제제는 비교를 위한 대조군으로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 야생형 BTK 폴리펩티드는 비교를 위해 사용된다.

[0224]

일부 실시양태에서, BTK 활성의 수준의 검출은 세포 내에서 BTK의 직접적인 기질의 인산화 수준 또는 BTK 키나제 캐스케이드의 인산화된 표적 수준을 측정함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, 세포는 B 림프구, 단핵세포 또는 대식세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 암세포주, 예컨대, 림프종, 백혈병 또는 골수종 세포주이다. 일부 실시양태에서, 세포주는 MCL, DLCL 또는 소포 림프종 세포주이다. 일부 실시양태에서, 세포주는 BTK 넥아웃 B 림프종 세포주, 예컨대, DT40 BTK 넥아웃 세포주이다. 일부 실시양태에서, 인 특이적 항체는 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에서 세포에서 특정 BTK 표적, 예컨대, PLC γ , ERK1/2(MAPK) 및 AKT의 인산화 수준을 검출하는 데에 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포는 BCR 신호전달 경로를 활성화시키기 위해 시험 화합물의 노출 전, 동안 또는 후에 먼저 자극된다. 일부 실시양태에서, 세포는 BCR 신호전달 경로를 활성화시키기 위해 시험 화합물의 노출 전, 동안 또는 후에 항-IgM 또는 항-IgG로 먼저 자극된다. 인산화된 단백질을 검출하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, 웨스턴 블롯팅 또는 면역조직화학을 포함한다.

[0225]

일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 변경된 BTK 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포로부터 정제된다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 재조합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 정제된 BTK는 BTK 활성 수준을 시험하는 데에 사용된다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드는 면역친화성 또는 크로마토그래피에 의해 정제된다.

[0226]

일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산으로 형질감염될 수 있고 BTK 활성이 모니터링될 수 있는 숙주 세포주가 상기 방법에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 야생형 BTK를 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 내생성 야생형 BTK의 발현을 결여한다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포는 변경된 BTK 폴리펩티드를 안정하게 발현한다. 일부 실시양태에서, 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 세포의 게놈 내로 삽입된다.

[0227]

일부 실시양태에서, 숙주 세포는 치킨 DT40 BTK -/- B 세포 또는 인간 BTK -/- B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 비-B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 비-B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CHO 세포 또는 주르카트 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 비-포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 곤충 세포, 세균 세포, 효모 세포 또는 식물 세포이다.

[0228]

일부 실시양태에서, BTK 활성의 수준은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내는 세포주를 사용함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, 상기 세포주는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 장기간 노출에 의해 내성에 대해 선택된 내성 MCL(예를 들면, Mino 또는 Jeko), DLBCL(예를 들면, OCI-Ly1, OCI-Ly2, OCI-Ly3, OCI-Ly4, OCI-Ly6, OCI-Ly7, OCI-Ly10, OCI-Ly18, OCI-Ly19, U2932, HBL-1, RIVA, 또는 TMD8) 또는 소포 림프종(예를 들면, DoHH2, Granta 519 또는 HF-1) 세포주이다. 일부 실시양태에서, 선택은 시험관내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 선택은 암세포를 투여받은 동물 모델의 생체내에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 내성 MCL 또는 DLBCL 세포주는 아미노산 위치 C481에서 BTK의 변경을 함유한다. 일부 실시양태에서, 변경은 C481S이다.

[0229]

BTK 억제에 대한 세포 기능 분석은 다양한 농도의 후보 BTK 억제제 화합물의 존재 또는 부재 하에서 세포주에서 BTK-매개된 경로의 자극(예를 들면, 라모스 세포에서 BCR 활성화)에 반응한 하나 이상의 세포 종점(endpoint)을 측정하는 단계를 포함한다. BCR 활성화에 대한 반응을 측정하기에 유용한 종점은 예를 들면, BTK의 자가인산화, BTK 표적 단백질(예를 들면, PLC- γ)의 인산화 및 세포질 칼슘 유입을 포함한다.

[0230]

일부 실시양태에서, 다운스트림 전사 표적 분석이 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에서 BTK 활성을 측정하는 데에 이용된다. 일부 실시양태에서, 다운스트림 전사 표적 분석은 NF- κ B 기초 분석이다. 일부 예에서, 레포터 단백질을 코딩하는 유전자는 BCR 경로 신호전달에 민감하고 BTK가 억제될 때 억제되는 NF- κ B 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 레포터 유전자는 루시페라제, 형광 단백질, 생체발광 단백질 및 효소로부터 선택된 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 상기 분석은 레포터 및 돌연변이체 BTK를 함유하는 숙주 세포를 포함한다. 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에서 유전자 발현 수준의 검출은 상기 시험 화합물이 돌연변이체 BTK의 존재 하에서 BCR 경로를 억제하는지를 표시한다. 일부 실시양태에서, 시험 화합물은 돌연변이체 BTK를 직접적으로 억제한다.

[0231]

많은 무세포 생화학적 분석(예를 들면, 키나제 분석) 및 세포 기능 분석(예를 들면, 칼슘 유입)을 위한 고효율 분석이 당분야에서 통상의 기술을 가진 자에게 잘 공지되어 있다. 추가로, 고효율 스크리닝 시스템이 상업적으로 입수가능하다(예를 들면, 자이마크 코퍼레이션(Zymark Corp.)(미국 매사추세츠주 홉킨톤 소재); 에어 테크니칼 인더스트리스(Air Technical Industries)(미국 오하이오주 멘토 소재); 벡크만 인스트루먼트 인코포레이티드(Beckman Instruments, Inc.)(미국 캘리포니아주 풀러톤 소재); 프리시전 시스템스 인코포레이티드(Precision Systems, Inc.)(미국 매사추세츠주 나틱 소재) 등 참조). 이들 시스템들은 전형적으로 샘플 및 시약 피펫팅, 액체 분배, 시간조절된 항온처리, 및 분석에 적합한 검출기(들)에서의 마이크로플레이트의 최종 판독을 포함하는 전체 절차를 자동화한다. 이에 따라 자동화된 시스템은 과도한 노력 없이 다수의 BTK 억제제 화합물들의 확인 및 특징규명을 가능하게 한다.

[0232]

일부 실시양태에서, BTK 활성 수준의 검출은 생체내 분석에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, BTK 활성 수준의 검출은 동물 모델에서 평가된다. 일부 실시양태에서, 동물 모델은 백혈병의 마우스 모델인 동물 모델이다. 이러한 동물 모델은 당분야에서 공지되어 있고, 예를 들면, AML 및 CLL의 마우스 모델을 포함한다(예를 들면, 문헌(Zuber, (2009) Genes and Development 23(7):877-89) 및 문헌(Pekarsky et al. (2007) J Cell Biochem. 100(5):1109-18) 참조). 일부 실시양태에서, 동물 모델은 Cys 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 발현하는 형질전환 동물이다. 일부 실시양태에서, 시험 화합물은 Cys 481에서 변경되어 있는 변경된 BTK를 발현하는 형질전환 동물에게 투여되고, BTK의 활성은 본원에 기재된 하나 이상의 분석에 의해 평가된다. 일부 실시양태에서, 분석은 시험 화합물을 투여받고 대조군과 비교된 형질전환 동물로부터 단리된 돌연변이 BTK 폴리펩티드로 수행된 키나제 분석이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 BTK 표적의 인산화 수준은 시험 화합물을 투여받고 대조군과 비교된 형질전환 동물로부터 수득된 B 세포 샘플에서 평가된다. 일부 실시양태에서, 대조군은 시험 화합물을 투여받지 않는 동물로부터 수득된 샘플이다. 일부 실시양태에서, 대조군은 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 투여받은 동물로부터 수득된 샘플이다.

[0233]

키트 및 제품

[0234]

본원에 기재된 진단 및 치료 적용에서 사용되기 위해, 키트 및 제품도 본원에 기재되어 있다. 이러한 키트는 하나 이상의 용기, 예컨대, 바이알, 튜브 등을 수용하도록 구획화된 담체, 포장물 또는 용기를 포함할 수 있고, 이때 이들 각각의 용기(들)는 본원에 기재된 방법에서 사용될 별개의 요소들 중 하나를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 및 시험 튜브를 포함한다. 용기는 예를 들면, 유리 또는 플라스틱을 비롯한 임의의 허용가능한 재료로부터 형성된다.

[0235]

일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 키트는 대상체에서 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 검출하는 데에 사용되거나 대상체에서 변경된 BTK 폴리펩티드를 검출하는 데에 사용되기 위한 키트이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 키트는 하나 이상의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 동반 진단제로서 사용되기 위한 키트이다. 일부 실시양태에서, 키트는 제2 세대 BTK 길항제로 치료될 환자의 선택, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 대상체의 확인, 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 대한 내성의 발생의 모니터링, 또는 이들의 조합을 위해 사용된다. 본원에서 제공된 키트는 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출, 변경된 BTK 폴리펩티드의 검출, 대상체로부터 수득된 세포에서의 BTK 활성의 검출, 시험관내에서 또는 생체내에서의 BTK 활성의 검출 또는 이들의 조합을 위한 하나 이상의 시약을 함유한다. 예시적인 시약은 올리고뉴클레오타이드, PCR 시약, 완충제, 항체, 키나제 활성을 측정하기 위한 BTK 기질, 효소 염색을 위한 기질, 발색체 또는 다른 물질, 예컨대, 슬라이드, 용기, 마이크로타이터 플레이트, 및 임의적으로 방법을 수행하기 위한 설명서를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 당업자는 다양한 물질들을 접촉하는 데에 사용될 수 있는 많은 다른 가능한 용기 및 플레이트, 및 시약을 인식할 것이다. 키트는 대조군 샘플, 예를 들면, 핵산 또는 단백질, 예를 들면, 본원에서 제공된 돌연변이 BTK 폴리펩티드, 또는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산도 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 돌

연번이체 BTK 발현의 검출을 위한 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 함유한다.

[0236] 일부 실시양태에서, 용기(들)는 임의적으로 조성물 중에 또는 본원에 개시된 또 다른 물질과 함께, 본원에 기재된 방법에 의해 확인된 하나 이상의 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제 또는 하나 이상의 제2 세대 BTK 억제제를 포함할 수 있다. 용기(들)는 임의적으로 투여를 위한 물질, 예컨대, 주사기, 바늘, 투약 컵 또는 바이알을 갖는다. 이러한 키트는 임의적으로 본원에 기재된 방법에서의 화합물의 사용에 관한 확인 설명서 또는 표지 또는 지시와 함께 화합물을 포함한다.

[0237] 일부 실시양태에서, 키트는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 포함하는, BTK 활성을 갖는 변경된 BTK 폴리펩티드 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다. 일부 실시양태에서, 키트는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 임의의 단리된 핵산 또는 이러한 핵산을 포함하는 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0238] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드, 또는 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변형은 BTK 폴리펩티드의 아미노산 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환이다.

[0239] **공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내는 세포주의 제조**

[0240] 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내는 B 세포 암세포주를 제조하는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, B 세포 암세포주는 야생형 BTK의 시스테인 481에 공유결합하는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, B 세포 암세포주는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37을 사용한 치료에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, B 세포 암세포주는 이브루티닙을 사용한 치료에 대한 내성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법에 의해 발생된 내성 세포주는 변경된 BTK 단백질을 발현한다. 일부 실시양태에서, BTK 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 481에 상응하는 아미노산 위치에서 변경된다.

[0241] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 B 세포 암세포주(즉, 모세포주)를 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제와 접촉시키는 단계 및 예정된 기간 동안 상기 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 예정된 기간 동안 증가하는 농도의 비가역적 BTK 억제제의 존재 하에서 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 농도는 약 0.01 μM 내지 약 100 μM , 예를 들면, 0.1 μM 내지 약 10 μM 이다. 일부 실시양태에서, 세포는 약 0.05 μM , 0.1 μM , 0.5 μM 또는 1 μM 의 비가역적 BTK 억제제의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 농도는 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제의 농도는 3배 증가된다. 일부 실시양태에서, 세포는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 1.5개월, 2개월, 2.5개월 또는 3개월 이상 동안 비가역적 BTK 억제제의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, 세포는 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 주마다 또는 이보다 더 시간 간격으로 분할되고 재플레이팅된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제를 함유하는 배양 배지는 매일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 주마다 또는 이보다 더 시간 간격으로 새로 공급된다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 야생형 BTK의 Cys 481에 공유결합한다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37이다. 일부 실시양태에서, 비가역적 BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0242] 일부 예에서, 모 B 세포 암세포주는 백혈병, 림프종 또는 골수종 세포주이다. 일부 예에서, 모 B 세포 암세포주는 DLBCL 세포주이다. 예시적인 DLBCL 세포주는 OCI-LY10, OCI-Ly3, U2932, RIVA, HBL-1 또는 TMD8 세포주를 포함하나 이들로 한정되지 않는 ABC-DLBCL 세포주, 및 OCI-Ly19 또는 OCI-Ly7을 포함하나 이들로 한정되지 않는 GCB-DLBCL 세포주를 포함한다. 일부 예에서, 모 B 세포 암세포주는 MCL 세포주이다. 예시적인 MCL 세포주는 Mino 및 Jeko 세포주를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일부 예에서, 모 B 세포 암세포주는 소포 림프종 세포주이다. 예시적인 소포 림프종 세포주는 DoHH2, Granta 519 및 HF-1 세포주를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0243] 일부 실시양태에서, 내성 세포주는 B 세포 수용체 경로 활성화의 증가에 의해 확인된다. 일부 실시양태에서, B 세포 수용체 경로 활성화의 증가는 치료된 세포주에서 다운스트림 표적이 이브루티닙의 존재 하에서의 모세포주

에 비해 이브루티닙의 존재 하에서 증가된 인산화를 나타내는지를 시험함으로써 확인된다. 일부 예에서, 인산화된 다운스트림 표적은 인산화된 RAF 또는 인산화된 MEK이다. 일부 실시양태에서, 내성 세포주는 이브루티닙만을 사용한 치료에 대한 내성을 나타내지만, 이브루티닙과 함께 MEK 억제제를 사용한 치료에 대한 민감성을 나타낸다.

[0244] **이브루티닙 내성 환자에서 비-BTK 돌연변이 - 이의 검출, 조성물 및 용도**

[0245] 본원에 기재된 바와 같이, 특정 경우, BTK 이외의 단백질에서의 돌연변이는 BTK 억제제, 예를 들면, 공유 및/또는 비가역적 억제제를 사용한 치료에 대한 환자의 내성을 야기한다. 일부 실시양태에서, 상기 돌연변이는 BTK 경로의 다운스트림 이펙터 단백질에 존재한다. 일부 실시양태에서, 상기 돌연변이는 기능 획득 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 상기 돌연변이는 BTK 경로의 다운스트림 이펙터 단백질의 항시적 활성화를 초래한다.

[0246] **PLC γ 2**

[0247] 일부 실시양태에서, 다운스트림 이펙터 단백질은 포스포리파제 C 감마 2(PLC γ 2)이다. PLC는 인지질 포스파티딜 이노시톨 4,5-비스포스페이트(PIP2)를 디아실 글리세롤(DAG) 및 이노시톨 1,4,5-트리포스페이트(IP3)로 절단한다. DAG는 막에 결합된 상태로 남아있고, IP3은 세포질 내로 가용성 구조물로서 방출된다. 그 다음, IP3은 세포질을 통해 확산하여 IP3 수용체, 특히 활면 소포체(ER)의 칼슘 채널에 결합한다. 이것은 칼슘의 세포질 농도를 증가시켜 세포내 변화 및 활성의 캐스케이드를 야기한다. 추가로, 칼슘 및 DAG는 함께 작용하여 단백질 키나제 C를 활성화시키고, 이 활성화는 BTK 키나제 경로의 다른 분자들을 인산화시키는 것으로 이어져 변경된 세포 활성을 초래한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 항시적으로 활성을 나타낸다(즉, BTK의 인산화를 요구하지 않는다).

[0248] 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 돌연변이는 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 환자의 내성을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 PLC γ 2의 기능 획득 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 PLC γ 2의 항시적 활성화를 초래한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 항시적 활성화는 세포내 칼슘의 이동, 및 세포외 신호-조절된 키나제(ERK) 경로 및 c-Jun NH2-말단 키나제(JNK) 미토겐-활성화된 단백질 키나제(MAPK) 경로의 활성화를 초래한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 돌연변이는 PLC γ 2의 위치 R665에 상응하는 아미노산에서의 아미노산 치환을 초래한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 돌연변이는 트립토판으로의 아르기닌의 치환(R665W)을 초래한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 돌연변이는 PLC γ 2의 위치 S707에 상응하는 아미노산에서의 아미노산 치환을 초래한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2의 돌연변이는 페닐알라닌으로의 세린의 치환(S707F)을 초래한다.

[0249] 본원에서 제공된, 변경된 BTK 폴리펩티드의 검출 방법들 중 임의의 방법이 PLC γ 2 폴리펩티드의 검출에도 적용될 수 있다. 예를 들면, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 게놈에서 체세포 돌연변이를 검출하는 경우 돌연변이체 특이적 핵산을 사용한 PCR에 의해 검출될 수 있거나, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 검출하는 경우 PLC γ 2 돌연변이체 특이적 항체에 의해 검출될 수 있다.

[0250] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 벡터가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 발현된 PLC γ 2 폴리펩티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0251] 본원에서 제공되어 있고 당분야에서 공지되어 있는, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드 및 핵산의 제조 방법들(핵산 발현 벡터 및 숙주 세포의 사용을 포함함) 중 임의의 방법이 본원에서 제공된 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드 및 핵산의 제조에도 적용될 수 있다.

[0252] 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 재조합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 숙주 세포로부터 정제된다.

[0253] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다.

[0254] 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경을 포함하는, PLC γ 2 활성을 갖는 단리된 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 변이체가 본원에서 제공된다.

- [0255] 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2에 비해 아미노산 위치 665 또는 707에서 아미노산의 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2에 비해 아미노산 위치 665 또는 707에서 아미노산의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665에서 위치 665의 아르기닌이 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 시스테인, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 세린, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로 치환되는 것이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665에서 트립토판으로의 아르기닌의 치환이다. 일부 실시양태에서, 치환은 R665W이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 707에서 위치 707의 아르기닌이 류신, 이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 시스테인, 쓰레오닌, 페닐알라닌, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 티로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로부터 선택된 아미노산으로 치환되는 것이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 707에서 페닐알라닌으로의 세린의 치환이다. 일부 실시양태에서, 치환은 S707W이다.
- [0256] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2에 비해 위치 665 또는 707에서 아미노산의 치환을 포함하고 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 아미노산 위치 665 또는 707에서의 변경, 및 하나 이상의 추가 아미노산 위치에서의 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드는 아미노산 위치 665 또는 707에서의 변경, 및 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 이상의 아미노산 위치에서의 변경을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 665에서의 변경은 R665W인 치환이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 707에서의 변경은 S707F인 치환이다.
- [0257] 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드는 펩티드 태그에 연결된, 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 포함하는 PLC γ 2 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 태그는 태그 특이적 항체에 의해 인식되는 에피토프 태그이다. 일부 실시양태에서, 태그는 에피토프 태그, 예컨대, c-myc, V-5, 혈구응집소(HA) 또는 FLAG 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, 태그는 친화성 태그, 예컨대, 바이오틴, 스트랩-태그, 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질(MBP), 글루타민-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 폴리(His) 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드는 검출가능한 단백질 또는 모이어티, 예컨대, 발광, 화학발광, 생체발광 또는 형광 단백질 또는 모이어티에 연결된, 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 포함하는 PLC γ 2 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 형광 단백질은 녹색(GFP), 적색(RFP), 청록색(CFP), 황색(YFP) 또는 청색(BFP) 형광 단백질이다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드는 효소, 예를 들면, 루시페라제 또는 베타-갈락토시다제에 연결된, 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 포함하는 PLC γ 2 폴리펩티드이다.
- [0258] 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 본원에 기재된 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드들 중 임의의 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 특정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 유추하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 표준 분자생물학 기법을 포함한다. 본원에서 제공된 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 예시적인 핵산이 제공된다. 유전 코드의 축퇴성으로 인해 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 변이체 핵산들이 존재한다는 것이 이해된다. 본원에서 제공된 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 이러한 변이체를 포괄한다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변경된 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 변경을 포함하고, 이때 코딩된 폴리펩티드는 서열번호 11에 기재된 야생형 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 위치에서 아미노산 아르기닌의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 서열번호 12에 기재된 핵산 서열(이때, 위치 665에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 변경됨으로써, 상기 코돈이 아르기닌을 코딩하지 않음), 또는 서열번호 12에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체(이때, 위치 665에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 아르기닌을 코딩하지 않거나, 위치 707에서 아미노산을 코딩하는 핵산 코돈이 세린을 코딩하지 않음)를 포함한다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 핵산 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 미스센스 돌연변이 또는 결실이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 코딩하는 핵산 코돈을 변화시키는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 707에

서 세린을 코딩하는 핵산 코돈을 변화시키는 미스센스 돌연변이이다.

[0261] 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 코딩하는 핵산 코돈은 CGT, CGC, CGA, CGG, AGA 또는 AGG이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 코딩하는 핵산 코돈을, 트립토판을 코딩하는 핵산 코돈으로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 트립토판을 코딩하는 핵산 코돈은 TGG이다.

[0262] 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 707에서 세린을 코딩하는 핵산 코돈은 TCT, TCC, TCA, TCG, AGT 또는 AGC이다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 707에서 세린을 코딩하는 핵산 코돈을, 페닐알라닌을 코딩하는 핵산 코돈으로 변화시킨다. 일부 실시양태에서, 페닐알라닌을 코딩하는 핵산 코돈은 TTT 또는 TTC이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 대상체가 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가능성이 있는지를 확인하는 방법으로서, (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 변경은 PLC γ 2의 R665W 또는 S707F 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0264] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 상기 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2의 R665W 또는 S707F 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0265] 특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 PLC γ 2의 R665W 또는 S707F 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0266] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 cDNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0267] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707을 코딩하는 핵산의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 위치 665 또는 707을 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용을

포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.

- [0268] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 665에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 아미노산 위치 665 또는 707에서 아르기닌을 갖는 야생형 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함한다.
- [0269] 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 종양 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유한다.
- [0270] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법에서 사용된 핵산은 대상체로부터 수득된 종양 세포 샘플로부터 분리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 골수 흡입물이다.
- [0271] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 억제제는 이브루티닙이다.
- [0272] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배종심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 중격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절외 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 중격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.
- [0273] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 샘플을 수득하기 전에 BTK 억제제로 치료받는다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 후에 수득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 수득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.
- [0274] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 665에서 변경을 포함하는 변경된 PLC γ 2 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 R665W 또는 S707F인 변경을 갖는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0275] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경을 포함하는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 R665W 또는 S707F인 변경을 갖는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0276] 특정 실시양태에서, 대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는 돌연변이체 PLC γ 2 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다.
- [0277] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 665 또는 707에서 변경되어 있는 변경된 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 아미노산 위치 665에서 아르기닌을 갖거나 위치 707에서 세린을 갖는 야생형 PLC γ 2를 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.
- [0278] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변경된 PLC γ 2를 검출하는

시스템으로서, (a) 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) PLC γ 2 폴리펩티드의 아미노산 665 또는 707을 코딩하는 핵산 영역을 플랜킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.

[0279]

특정 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 초래하는, PLC γ 2를 코딩하는 내생 유전자의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 (a) 코딩된 PLC γ 2 폴리펩티드가 서열번호 11에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 665 또는 707에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, PLC γ 2 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF- κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PLC γ 2 폴리펩티드의 변형은 R665W 또는 S707F이다. 일부 실시양태에서, 예정된 시간 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월이다.

[0280]

일부 실시양태에서, BTK 억제제는 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 140 mg, 하루에 420 mg, 하루에 560 mg 또는 하루에 840 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0281]

CARD11

[0282]

일부 실시양태에서, 다운스트림 이펙터 단백질은 CARD 함유 MAGUK 단백질 1(Carma 1)로서도 공지되어 있는 캐스파제 동원 도메인 함유 단백질 11(CARD11)이다. CARD11은 전형적으로 다중단백질 복합체의 조립에서 분자 스카폴드로서 작용하는 MAGUK(막-회합된 구아닐레이트 키나제) 패밀리에 속한다. MAGUK 패밀리 구성원은 구아닐레이트 키나제와 유사하게 SH3 도메인, PDZ 도메인 및 GuK 도메인을 함유한다. 또한, CARD11은 아미노-말단 CARD 도메인(캐스파제 동원 도메인)을 함유한다. 이 도메인은 아포토시스 및 NF- κ B 활성화의 조절에 관여하는 다수의 CARD 도메인 함유 단백질들과 상호작용을 형성하는 데 있어서 중요한 역할을 수행한다. CARD11은 주로 림프구에서 발현되고 Bc110의 CARD 도메인과 회합한다. CARD11은 과다발현된 경우 Bc110의 인산화 및 NF- κ B의 활성화를 유발한다.

[0283]

일부 실시양태에서, CARD11의 돌연변이는 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 환자의 내성을 초래한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 CARD11의 기능 획득 돌연변이이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 NF- κ B-매개된 전사의 항시적 활성화를 초래한다. 일부 실시양태에서, CARD11의 돌연변이는 CARD11의 아미노산 위치 232에서 아미노산 삽입을 초래한다. 일부 실시양태에서, CARD11의 돌연변이는 아미노산 위치 L232에서 류신의 삽입을 초래한다. 일부 실시양태에서, 변형은 L232LL이다. 일부 실시양태에서, CARD11의 돌연변이는 아미노산 위치 L232에서 이소류신의 삽입을 초래한다. 일부 실시양태에서, 변형은 L232IL 또는 L232LI이다.

[0284]

본원에서 제공된, 변경된 BTK 폴리펩티드의 검출 방법들 중 임의의 방법이 CARD11 폴리펩티드의 검출에도 적용될 수 있다. 예를 들면, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 게놈에서 체세포 돌연변이를 검출하는 경우 돌연변이체 특이적 핵산을 사용한 PCR 방법에 의해 검출될 수 있거나, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 검출하는 경우 CARD11 돌연변이체 특이적 항체에 의해 검출될 수 있다.

[0285]

일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 벡터가 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 발현된 CARD11 폴리펩티드를 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0286]

본원에서 제공되어 있고 당분야에서 공지되어 있는, 본원에서 제공된 변경된 BTK 폴리펩티드 및 핵산의 제조 방

법들(핵산 발현 벡터 및 숙주 세포의 사용을 포함함) 중 임의의 방법이 본원에서 제공된 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드 및 핵산의 제조에도 적용될 수 있다.

- [0287] 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드가 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 재조합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 숙주 세포로부터 정제된다.
- [0288] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 이브루티닙, PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 또는 ONO-WG-37인 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 BTK 억제제에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 함유한다.
- [0289] 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 L232에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 포함하는, CARD11 활성을 갖는 단리된 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 변이체가 본원에서 제공된다.
- [0290] 일부 실시양태에서, 변형은 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11에 비해 아미노산 위치 L232에서 아미노산의 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형은 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11에 비해 위치 L232에서 아미노산의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형은 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에서 류신의 삽입(예를 들면, L232LL)이다.
- [0291] 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11에 비해 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에서 류신의 삽입을 포함하고 하나 이상의 추가 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드는 아미노산 위치 232에서의 류신의 삽입, 및 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개 또는 20개 이상의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치 232에서의 변형은 L232LL이다.
- [0292] 일부 실시양태에서, CARD11 폴리펩티드는 펩티드 태그에 연결된, 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에서 변형을 포함하는 CARD11 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 태그는 태그 특이적 항체에 의해 인식되는 에피토프 태그이다. 일부 실시양태에서, 태그는 에피토프 태그, 예컨대, c-myc, V-5, 혈구응집소(HA) 또는 FLAG 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, 태그는 친화성 태그, 예컨대, 바이오틴, 스트랩-태그, 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 또는 폴리(His) 태그(그러나, 이들로 한정되지 않음)이다. 일부 실시양태에서, CARD11 폴리펩티드는 검출가능한 단백질 또는 모이어티, 예컨대, 발광, 화학발광, 생체발광 또는 형광 단백질 또는 모이어티에 연결된, 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에서 변형을 포함하는 CARD11 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 형광 단백질은 녹색(GFP), 적색(RFP), 청록색(CFP), 황색(YFP) 또는 청색(BFP) 형광 단백질이다. 일부 실시양태에서, CARD11 폴리펩티드는 효소, 예를 들면, 루시퍼라제 또는 베타-갈락토시다제에 연결된, 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에서 변형을 포함하는 CARD11 폴리펩티드이다.
- [0293] 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 본원에 기재된 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드들 중 임의의 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 본원에서 제공된다. 특정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 유추하는 방법은 당분야에서 공지되어 있고, 표준 분자생물학 기법을 포함한다. 본원에서 제공된 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 예시적인 핵산이 제공된다. 유전 코드의 축퇴성으로 인해 동일한 폴리펩티드를 코딩하는 다수의 변이체 핵산들이 존재한다는 것이 이해된다. 본원에서 제공된 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 이러한 변이체를 포괄한다.
- [0294] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 변형된 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 변형을 포함하고, 이때 코딩된 폴리펩티드는 서열번호 19에 기재된 야생형 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232에 상응하는 위치에서 아미노산의 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 핵산은 서열번호 20에 기재된 핵산 서열, 또는 서열번호 20에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드에 대한 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함한다.
- [0295] 일부 실시양태에서, 대상체가 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 보다 낮은 반응성을 나타내거나 나타내게 될 가

능성이 있는지를 확인하는 방법으로서, (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 CARD11 내의 L232LL 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0296]

특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 BTK 억제제를 제공받는 대상체가 치료에 대한 내성을 발생시켰거나 발생시킬 가능성이 있는지를 모니터링하는 방법으로서, (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료에 대한 내성을 나타내거나 내성을 나타내게 될 가능성이 있는 것으로서 대상체를 특징짓는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 CARD11 내의 L232LL 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0297]

특정 실시양태에서, 암의 치료를 위해 비가역적 BTK 억제제를 제공받는 대상체의 치료를 최적화하는 방법으로서, (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변경되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 수득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 상기 변경을 갖는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하거나 상기 대상체가 상기 변경을 갖지 않는 경우 비가역적 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 변경된 키나제를 억제하는 제2 세대 BTK 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체로부터 샘플을 수득하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 변경을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 변경은 CARD11 내의 L232LL 삽입을 포함한다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 또는 비가역적 억제제이다.

[0298]

상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 cDNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 게놈 DNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 전체 RNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 분석에서 사용될 핵산 분자는 mRNA이다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법은 RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0299]

상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232를 코딩하는 핵산의 증합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, PCR 증폭은 CARD11 폴리펩티드의 아미노산 위치 232를 코딩하는 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 증폭된 핵산을 서열결정하는 단계를 포함한다.

[0300]

상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고, 이때 상기 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 아미노산 위치 232에서 변경되어 있는 변경된 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하고; (b) 야생형 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하지 않는다. 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 시험은 서열 특이적 핵산 프로브를 사용한 PCR 증폭을 포함한다.

[0301]

일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 대상체로부터 수득된 하나 이상의 종양 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법들에서 사용될 샘플은 순환 종양 DNA(ctDNA)를 함유한다.

[0302]

상기 방법들의 일부 실시양태에서, 상기 방법에서 사용된 핵산은 대상체로부터 수득된 종양 세포 샘플로부터 단리된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프 샘플 또는 골수 흡입물이다.

- [0303] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CARD11 억제제는 이브루티닙이다.
- [0304] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 암은 혈액암이다. 일부 실시양태에서, 암은 B 세포 악성종양이다. 일부 실시양태에서, 암은 백혈병, 림프종 및 골수종으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, B 세포 악성종양은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소림프구성 림프종(SLL), 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 활성화된 B 세포 미만성 거대 B 세포 림프종(ABC-DLBCL), 배중심 미만성 거대 B 세포 림프종(GCB DLBCL), 일차성 중격동 B 세포 림프종(PMBL), 비-호지킨 림프종, 버킷 림프종, 소포 림프종, 면역모세포성 대세포 림프종, 전구체 B 림프모세포성 림프종, 전구체 B 세포 급성 림프모세포성 백혈병, 털세포 백혈병, 맨틀 세포 림프종, B 세포 전구림프구성 백혈병, 림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 비장 변연부 림프종, 형질세포 골수종, 형질세포종, 림프절의 변연부 B 세포 림프종, 림프절 변연부 B 세포 림프종, 중격동(흉선) 거대 B 세포 림프종, 혈관내 거대 B 세포 림프종, 일차성 삼출 림프종 또는 림프종모양 육아종증이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 고형 종양을 갖는다.
- [0305] 상기 방법들의 일부 실시양태에서, 대상체는 샘플을 획득하기 전에 BTK 억제제로 치료받는다. 일부 실시양태에서, 샘플은 비가역적 BTK 억제제의 최초 투여로부터 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월 또는 24개월 후에 획득된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 BTK 억제제를 사용한 치료 과정에 걸쳐 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회 또는 10회 획득된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 BTK 억제제가 최초로 투여될 때 BTK 억제제를 사용한 치료에 반응한다.
- [0306] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 232에서 변형을 포함하는 변형된 CARD11 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 L232LL인 변형을 갖는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0307] 특정 실시양태에서, 아미노산 위치 232에서 변형을 포함하는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 키트는 L232LL인 변형을 갖는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.
- [0308] 특정 실시양태에서, 대상체에서 비가역적 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변형된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변형되어 있는 돌연변이체 CARD11 폴리펩티드 또는 이의 부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 상기 마이크로어레이는 마이크로칩 상에 함유되어 있다.
- [0309] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변형된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 232에서 변형되어 있는 변형된 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하고, (ii) 야생형 CARD11을 코딩하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.
- [0310] 특정 실시양태에서, 대상체에서 BTK 억제제를 사용한 억제에 대한 내성을 부여하는 변형된 CARD11을 검출하는 시스템으로서, (a) 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플; 및 (b) CARD11 폴리펩티드의 아미노산 232를 코딩하는 핵산 영역을 플랭킹하는 한 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 시스템이 본원에 기재되어 있다.
- [0311] 특정 실시양태에서, 혈액암을 갖는 환자의 유지 치료 방법으로서, (a) 치료 유효 용량의 BTK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 유지 치료 요법을 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 상기 대상체가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변형을 초래하는, CARD11을 코딩하는 내생성 유전자의 돌연변이를 갖는지를 확인하기 위해 유지 치료 요법의 과정에 걸쳐 예정된 시간 간격으로 환자를 모니터링하는 단계를 포함하는 유지 치료 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모니터링은 (a) 코딩된 CARD11 폴리펩티드가 서열번호 19에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 232에 상응하는 아미노산 위치에서 변형되어 있는지를 확인하기 위해 대상체로부터 획득된, CARD11 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 함유하는 샘플을 시험하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 중단하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체가 돌연변이를 갖지 않는 경우 BTK 억제제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은

대상체가 변형을 갖는 경우 LYN, SYK, JAK, PI3K, MAPK, MEK 또는 NF κ B의 억제제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, CARD11 폴리펩티드의 변형은 L232LL이다. 일부 실시양태에서, 예정된 시간 간격은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월 또는 8개월이다.

[0312] 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 하루에 약 10 mg 내지 하루에 약 2000 mg, 하루에 약 50 mg 내지 하루에 약 1500 mg, 하루에 약 100 mg 내지 하루에 약 1000 mg, 하루에 약 250 mg 내지 하루에 약 850 mg, 또는 하루에 약 300 mg 내지 하루에 약 600 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 이브루티닙은 하루에 약 140 mg, 하루에 420 mg, 하루에 560 mg 또는 하루에 840 mg의 1일 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 공유 및/또는 비가역적 BTK 억제제이다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙(PCI-32765), PCI-45292, PCI-45466, AVL-101, AVL-291, AVL-292 및 ONO-WG-37로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, BTK 억제제는 이브루티닙이다.

[0313] 실시예

[0314] 이들 실시예는 예시 목적으로만 제공되고, 본원에서 제공된 특허청구범위를 한정하기 위해 제공되는 것이 아니다.

[0315] 실시예 1

[0316] 이 실시예에서, 공유 브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제 이브루티닙을 사용한 치료를 제공받는 백혈병 환자에서 BTK의 돌연변이를 확인하였다.

[0317] 만성 림프구성 백혈병(CLL)을 앓고 있는 환자를 하루에 560 mg의 용량으로 다수의 주기의 이브루티닙 치료로 치료하였다. 대략 18개월의 치료 후, 1명의 환자는 임상 질환 진행을 나타내었다. 진행은 절대 림프구 수(ALC)의 상승 및 증가된 림프절 크기를 특징으로 하였다. 그 다음, 이브루티닙의 용량을 하루에 560 mg에서 하루에 840 mg까지 증가시켰다. 그러나, 증가된 용량은 질환 진행을 억제하지 못하였다. 후속 연구에서 또 다른 환자를, 벤다무스틴 및 리툭산과 함께 420 mg 이브루티닙을 사용하는 주기로 치료하였다. 이 환자도 대략 12개월의 치료 후 임상 질환 진행을 나타내었다.

[0318] 연구 전, 치료 동안, 및 환자가 세트 IWCLL 평가 기준에 의해 진행된 질환을 갖는 것으로서 간주되었을 때 환자로부터 전혈을 채취하였다. 전혈은 구연산나트륨을 항응고제로서 갖는 BD 배큐테이너(Vacutainer) 세포 준비 튜브(CPT) 내로 채취되었다. 채취된 전혈을 채혈 48시간 이내에 분석 장소로 운반하였고, 이 장소에서 CPT 채취 튜브를 실온에서 1800 RCF에서 수평 로터 원심분리기 내에서 20분 동안 즉시 원심분리하였다. 상부 혈장 성분의 흡입 후 피펫을 이용하여 혈장 층 아래의 말초 혈액 단핵세포(PBMC) 층을 조심스럽게 채취하였다. 채취된 세포를 5분 동안 시그마 적혈구 세포(RBC) 용해 완충제(카탈로그 번호 R 7757)에 재현탁하여 잔류 RBC를 제거한 후 PBS로 2회 세척하여 용해를 중단시키고 원심분리하여 세포 펠렛을 수집하였다. 일부 경우, 이 시점에서 B 세포, T 세포 또는 단핵세포의 농축을 위해 PBMC 펠렛을 자기 비드로 분류하였다. 후술된 RNA 분석을 위해, PBMC 세포 펠렛을 퀴아젠(Qiagen) RLT 용해 완충제에 재현탁하였고 분석할 때까지 -80℃ 냉동기 내에 넣어두었다. 저장 및 추후 분석에서의 사용을 위해, 세포 펠렛을 가시적인 세포로서 동결하였고, 약하고 느리게 펠렛에 적가된 90% FBS 및 10% DMSO 용액에 재현탁하였다. 이들 바이알을 미스터 프로스티(Mister Frosty) 용기(날진(Nalgen e[®]))에서 미리 냉각시키고 24시간 동안 -80℃ 냉동기 내에 넣어둔 후, 액체 질소 탱크 내에서 영구적으로 저장하였다.

[0319] 퀴아젠 올 프랩(All Prep) 키트를 사용하여 PBMC로부터 전체 DNA, RNA 및 단백질을 분리하였다. 아질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)로부터 구입된 키트(카탈로그 #600184) 및 하기 역방향 BTK 프라이머(BTK#2R로서 지칭됨)를 사용한 역전사를 통해 BTK mRNA의 제1 가닥 cDNA를 합성하였다: 5'-aagtgaattggggccttggtg-3'(서열번호 9). 반응을 위해 제조자의 설명서를 따랐다. 주형 RNA, 유전자 특이적 프라이머, dNTP 혼합물 및 완충제를 마이크로튜브 내에서 혼합하였다. 혼합물을 5분 동안 65℃에서 변성시키고 프라이머를 5분 동안 25℃에서 어닐링하였다. 그 다음, DTT 및 아큐스크립(AccuScript) 고신뢰성 역전사효소를 첨가하고, DNA를 30분 내지 90분 동안 42℃에서 연장시키고 4℃까지 냉각시킨 후 -20℃에서 유지하였다.

[0320] 그 다음, 역전사 반응으로부터 수득된 mRNA-cDNA 혼합체를, 아질런트 테크놀로지스로부터 구입된 PfuUltra II HS 증합효소를 사용한 증합효소 연쇄 반응(PCR)을 통해 증폭하였다. 1 내지 3 μ l의 역전사 반응물을 상기 PCR 반응에서 사용하였다. 동일한 역방향 프라이머 BTK#2R을 하기 정방향 프라이머(BTK#2F로서 지칭됨)와 함께 사용하였다: 5'-agtccaccttccaagtct-3'(서열번호 10). 열순환기를 이용한 증폭을 위해 하기 PCR 프로토콜을 이용하였다: 단계 1 - 2분 동안 95℃에서 변성; 단계 2 - 30초 동안 95℃에서 변성, 30초 동안 55℃에서 어닐링, 및

1.25분 동안 68℃에서 연장; 단계 3 - 단계 2의 39회 반복; 단계 4 - 5분 동안 68℃에서 연장, 4℃까지 냉각, 및 이어서 -20℃에서 유지. 10%의 PCR 생성물을 에티덤 브로마이드 아가로스 겔 전기영동으로 분석하였다. 그 다음, 퀴아퀵(QiaQuick) PCR 생성물 정제 키트를 사용하여 샘플의 나머지를 정제하였다.

[0321] 시퀀텍(Sequetech)에 의해 디자인되고 합성된 프라이머를 사용하여 시퀀텍 코포레이션(Sequetech Corporation) (미국 캘리포니아주 마운틴 뷰 소재)에서 전체 BTK 개방 판독 프레임의 양 가닥들의 서열결정을 수행하였다. BTK의 야생형 mRNA 서열(등록번호 NM_000061.2)은 서열번호 3에 기재되어 있다. 내성 환자 #1의 DNA 서열(200-004/200-007)은 서열번호 7에 기재되어 있다. 내성 환자 #2의 DNA 서열(350-105)은 서열번호 8에 기재되어 있다. 서열결정은 이브루티닙을 제공받기 전/치료 초기에 2명의 환자들로부터 채취된 세포 내의 mRNA 서열이 야생형이라는 것, 즉 상기 RNA가 BTK의 아미노산 단백질 서열의 위치 481에서 정상 시스테인을 코딩한다는 것을 보여주었다. 내성 환자들의 치료에서 연구 말기(EOS)/후기에 수득된 세포에서 상기 mRNA의 서열은 이 mRNA가 BTK의 위치 481에서 시스테인 대신에 세린을 코딩하도록 변경되어 있다. 내성 환자 #1은 아데닌(a)-1634로의 티민(t)-1634의 미스센스 돌연변이(즉, t1634a)를 가졌다. 이 돌연변이는 시스테인-481 코돈인 TGC를 AGC(세린)로 변화시킨다. 내성 환자 #2는 사이토신(c)-1635로의 구아닌(g)-1635의 미스센스 돌연변이(즉, g1635c)를 가졌다. 이 돌연변이도 시스테인-481 코돈인 TGC를 TCC(세린)로 변화시킨다.

[0322] 고도 민감성 대립형질 특이적 PCR 분석(1% 분석 민감성)은 재발된 샘플의 게놈 DNA에서의 돌연변이의 독특한 존재를 추가로 확인시켜주었는데, 이것은 상기 돌연변이가 환자의 치료 동안에 획득되었다는 것을 암시한다. 게놈 BTK DNA의 PCR을 위해, 하기 4개의 프라이머들을 사용하였다: BTKg-F1: TGATGGGCTCCAAATCCCTG(서열번호 13); BTKg-R1: AATGATGGCACCAGCAGC(서열번호 14); BTKg-F2: AATCCCTGCTTGCTTCACA(서열번호 15); BTKg-R2: TTGATGGGCTCAGCACTGG(서열번호 16).

[0323] 서열결정될 샘플의 준비를 위한 별도의 방법에서, 치료 전 및 질환 진행 후에 QIAamp RNA 혈액 미니 키트를 사용하여 환자의 PBMC로부터 전체 RNA를 분리하였다. 먼저 폴리A 선택을 이용하여 mRNA를 정제하고 글로빈 RNA를 제거한 후(발현 분석) 화학적으로 단편화하였다. 무작위 욕량체 프라이머의 역전사를 이용하여 mRNA 단편을 단일 가닥 cDNA로 전환시켰다. 그 다음, 제2 가닥을 발생시켜 이중 가닥 cDNA를 생성한 후, 분자의 각각의 말단에 서 말단 복구 및 단일 A 염기의 추가를 수행하였다. 그 다음, 유동 세포 표면의 부착을 가능하게 하는 어댑터를 단편의 각각의 말단에 라이게이션시켰다. 상기 어댑터는 라이브러리가 다중체화 동안에 풀링되게 하는 고유 지수(unique index) 서열(발현 분석)을 함유한다. 그 다음, PCR을 수행하여 라이게이션된 물질을 증폭하고 농축함으로써 cDNA 라이브러리를 생성한 후, TruSeq SBS 키트를 사용하여 클러스터 발생 및 직접적인 일루미나(일루미나 HiSeq 2000) 합성에 의한 서열결정을 수행하였다. 별도의 서열결정 레인에서 런닝하는 각각의 샘플을 사용하여 쌍형성-말단 서열결정을 수행하였다. 평균 88x 적용범위(coverage)/샘플로 1억개 초과 판독치를 수득하였다.

[0324] 실시예 2

[0325] 본 실시예에서 BTK C481S 돌연변이체를 발현하는 세포주를 발생시킨다. BTK C481S 돌연변이체를 코딩하는 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결되어 돌연변이체 단백질을 발현하도록 상기 핵산을 발현 벡터 구축물 내로 삽입한다. 재조합 단백질 생성을 위해 BTK C481S 구축물을 세포주, 예컨대, 곤충 세포, 또는 BTK 결핍 세포주, 예컨대, CHO 세포 또는 주르카트 T 세포, 또는 치킨 DT40 BTK -/- B 세포주 또는 인간 BTK 녹아웃 B 세포주 내로 안정적으로 형질감염시킨다.

[0326] 제2 세대 화합물의 스크리닝, 또는 시험관내 분석, 예컨대, 키나제 분석에서 사용될 정제된 단백질의 생성을 위해 상기 세포주를 사용한다.

[0327] 시험관내 분석을 위해, C481S BTK 재조합 단백질을 세포, 예컨대, 곤충 세포에서 생성하고 균질한 수준까지 정제하고, 보편적인 펩티드 또는 특이적 다운스트림 기질(예컨대, PLC γ)을 비롯한 다양한 기질들에 대한 그의 티로신 키나제 특이적 활성화에 대해 평가하고, 시험관내 키나제 분석(C481S, ATP, 보조인자 Mg/Mn, 펩티드 기질)으로 분석한다. PCi-32765(이브루티닙)를 음성 대조군으로서 사용한다.

[0328] 치킨 DT40 BTK -/- 또는 인간 BTK -/- 세포를 야생형 BTK 또는 C481S BTK로 안정하게 형질감염시키고 HTS 유형 기능 분석에서 사용한다. 한 예에서, 세포를 항-IgM/G로 자극하여 이들 세포주에서 B 세포 수용체(BCR) 및 이에 따라 다운스트림 BTK를 라이게이션시키고 활성화시킨다. 자극으로부터 18시간 후, 연속 회석된 화합물의 존재 및 부재 하에서 표면 CD69 활성화를 이들 세포에서 평가한다. C481S에 공유결합하는 BTK 억제제는 세포 세척 실험 후 CD69를 억제하고 감소시킬 것으로 예상된다.

[0329]

실시예 3

[0330]

이브루티닙은 활성 부위에서 C481의 설프하이드릴 기와의 마이클 첨가반응을 통해 BCR 신호전달의 필수 성분인 BTK에 공유결합하여 키나제 활성의 강력한 비가역적 억제를 발생시킨다(Honigberg et al, PNAS 107(29): 13075-13080). 구조 모델링은 C481S 돌연변이가 이 공유결합을 파괴할 것이지만, 이브루티닙이 효소의 활성 부위 내로 피팅되는 능력을 파괴하지는 않을 것임을 입증한다(도 1). BCR 신호전달에 반응하여, LYN 및 SYK는 Y551에서 BTK를 인산화시켜 Y223에서 BTK 자가인산화를 유도함으로써 키나제 활성화를 유발한다. 따라서, Y223의 인산화는 BTK 효소 활성을 반영한다. 면역블롯 분석은 환자가 이브루티닙에 반응할 때 p-BTK(Y223)가 기준에 비해 상대적으로 감소되었고 질환 재발 시 상승되었다는 것을 입증한다(도 2a, 레인 3 및 4). p-ERK의 변화는 환자의 임상 반응 동안에 감소한 후 질환 재발 시 기준을 초과하여 상승하고 4주 후 재평가되었을 때 더 증가하면서 p-BTK와 유사한 경향을 나타내었다. 다른 한편으로, p-AKT는 이브루티닙 치료 시 증가하였고 임상 과정에 따라 변화하지 않았다. 종합하건대, p-BTK 및 p-ERK의 수준의 변화는 서로 상관관계를 가졌고 상기 돌연변이가 이브루티닙의 존재 하에서 BCR 신호전달을 가능하게 한다는 것을 암시한다.

[0331]

예시적인 방법에서, 부위 Y551에서의 BTK 인산화 및 특정 관련된 신호전달 사건도, 인간 BTK를 코딩하는 플라스미드로 형질감염되어 있는 배양된 세포(예를 들면, HEK293T 세포)를 사용한 유동 세포측정 분석으로 모니터링한다. HEK293T 세포에서의 발현은 BTK 내의 Y551 부위의 항시적 인산화를 초래하고, 이것은 형광-커플링된 항체(비디 바이오사이언시스(BD Biosciences) 카탈로그 #558134)를 사용한 유동 세포측정에 의해 검출될 수 있다. HEK293T 세포에서의 BTK의 발현도 T202/Y204에서 Erk의 인산화를 초래하고, 이것은 비디 바이오사이언시스 카탈로그 #612566을 사용한 유동 세포측정에 의해 검출될 수 있다. BTK에서의 Y551 및 Erk에서의 T202/Y204의 인산화는 이브루티닙(및 다사티닙)을 사용한 치료에 의해 용량 의존적으로 억제되고, 항시적 인산화는 BTK의 키나제 불활성 돌연변이체가 야생형 또는 C481S BTK 대신에 발현될 때 일어나지 않는데, 이것은 이들 인산화 사건들이 일어나기 위해 BTK 키나제 활성이 요구된다는 것을 시사한다. 비디 바이오사이언시스 카탈로그 #558527을 사용한 유동 세포측정으로 총 BTK 발현 수준을 모니터링한다.

[0332]

세포의 준비를 위한 예시적인 절차는 다음과 같다: HEK293T 세포를 10 cm 플레이트 내로 시딩하고 밤새 부착되게 한다. CMV 프로모터의 조절 하에 있는 인간 야생형 또는 C481S 돌연변이체 BTK 또는 C481A 돌연변이체 BTK 또는 K430A 돌연변이체 BTK(카복실-말단 6His 융합체)를 함유하는 플라스미드와 함께 인산칼슘 방법을 사용하여 세포를 형질감염시킨다. 형질감염으로부터 대략 16시간 후, 세포를 탈착시키고 다중-웰 플레이트 내로 시딩한다. 대략 24시간 후, 세포를 이브루티닙 또는 다른 억제제로 처리하고 파라포름알데하이드로 제자리에서 고정시키거나; 기계적으로 탈착시키고 새로운 약물 무함유 배지로 세척하고 1.5시간 동안 항온처리한 후 고정시킨다. 투과성을 갖는 세포를 표지된 비디 바이오사이언시스 형광-표지된 항체로 염색하고 비디 캔토II(CantoII) 유동 세포측정기 상에서 분석한다. 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 및 형광-마이너스-원(fluorescence-minus-one) 대조군을 양성 세포 집단에 대한 게이팅에 사용하고, 게이트를 각각의 샘플에 동등하게 적용한다. 총 양성 세포 수를 BTK 발현 세포의 비로서 수득한다.

[0333]

실시예 4

[0334]

본 실시예에서, 환자들의 유전자 발현 데이터를 분석하였다. 확립된 27-유전자 BCR 발현 시그니처(Blood, 2011 Jan 13;117(2):563-74)를 사용한 유전자 발현에 대한 RNA-Seq 데이터는 반응 환자의 BCR 시그니처가 치료 전 기준에 비해 상대적으로 하향조절되었다는 것을 입증하였다(도 2b). 그러나, 이 유전자 클러스터의 발현은 초기 및 4주 후에 평가되었을 때 두 재발 단계들에서 증가하였다.

[0335]

RNA-Seq를 수행하기 위해, QIAamp RNA 혈액 미니 키트를 사용하여 치료 전 및 질환 진행 후에 환자의 PBMC로부터 전체 RNA를 분리하였다. 먼저 폴리A 선택을 이용하여 mRNA를 정제하고 글로빈 RNA를 제거한 후(발현 분석) 화학적으로 단편화하였다. 무작위 육량체 프라이머의 역전사를 이용하여 mRNA 단편을 단일 가닥 cDNA로 전환시켰다. 그 다음, 제2 가닥을 발생시켜 이중 가닥 cDNA를 생성한 후, 분자의 각각의 말단에서 말단 복구 및 단일 A 염기의 추가를 수행하였다. 그 다음, 유동 세포 표면의 부착을 가능하게 하는 어댑터를 단편의 각각의 말단에 라이게이션시켰다. 상기 어댑터는 라이브러리 다중체화 동안에 풀링되게 하는 고유 지수 서열(발현 분석)을 함유한다. 그 다음, PCR을 수행하여 라이게이션된 물질을 증폭하고 농축함으로써 cDNA 라이브러리를 생성한 후, TruSeq SBS 키트를 사용하여 클러스터 발생 및 직접적인 일루미나(일루미나 HiSeq 2000) 합성에 의한 서열결정을 수행하였다. 별도의 서열결정 레인에서 런닝하는 각각의 샘플을 사용하여 쌍형성-말단 서열결정을 수행하였다. 평균 88x 적용범위/샘플로 1억개 초과 판독치를 수득하였다. Bowtie2 정렬기와 함께 TopHat 팩키지를 사용하여 판독치를 HG19 게놈 조립에 정렬하였다. 게놈 또는 잡재적 PCR 중복체에 맵핑되지 않은 판독치는 샘플

(samtool)로 배제하였다. 커프링크스(Cufflinks) 및 커프머지(cuffmerge)를 사용하여 전사체 발현 수준을 정량하였다. 백만 맵핑된 판독치 당 킬로베이스 당 판독치(RPKM)를 산출하였다: 각각의 전사체 서열에 맵핑된 판독치의 수를 kbs 단위의 주형 길이로 표준화하고 전체 전사체에 맵핑된 판독치의 수로 나누었다. 클러스터 3.0 소프트웨어를 사용하여 BCR 시그니처 유전자에 대한 계층 클러스터 분석을 수행하였고, 트리뷰(TreeView)를 사용하여 열 맵을 발생시켰다.

[0336] 특히, 유전자 발현의 변화 경향이 p-BTK 및 p-ERK의 변화 경향과 유사하였다. 이와 더불어, 돌연변이 분석, 신호 전달도입 및 유전자 발현 프로파일링으로부터의 데이터는 1) BTK C481S 돌연변이의 획득이 이브루티닙의 존재 하에서 CLL 세포에서 BCR 신호전달을 가능하게 하고 2) 치료 과정에 걸쳐 BCR 신호전달 활성이 환자의 질환 상태와 상관관계를 갖는다는 것을 강력히 암시한다.

[0337] **실시예 5**

[0338] 본 실시예는 이브루티닙이 반응 환자의 말초 혈액으로부터 수득된 CLL 세포의 증식을 억제하지만 BTK C481S 돌연변이를 갖는 재발된 환자로부터 수득된 CLL 세포의 증식을 억제하지는 못한다는 것을 입증한다. Ki-67+ 세포의 수 및 세포 크기는 반응 환자에서 이브루티닙 치료 과정에 걸쳐 감소하였으나 돌연변이를 갖는 재발된 환자에서는 감소하지 않았다. 현재 환자의 일련의 샘플들의 분석도 반응 샘플에서 Ki-67+ 양성 CLL 세포의 백분율이 4.5%에서 0.53%까지 감소되었다는 것을 입증하였다. 재발 1에서 Ki-67+ 세포의 수는 5.3%까지 증가한 후, 재발 2에서 8.0%까지 증가하였다(도 3a). 증식에 대한 이브루티닙의 영향에 대한 추가 증거로서, 재발 후 증가된 증식을 반영하는 세포 크기의 변화도 입증되었다(도 4). 현재 연구에서, 재발된 샘플에서 증식 CLL 집단의 크기는 19% 내지 20%에서 35% 내지 36%까지 증가하였다(도 3b, 제2열). 이브루티닙(250 또는 500 nM)을 사용한 환자의 CLL 세포의 치료는 반응 전 샘플 및 반응 샘플에서 BrdU 도입을 완전히 차단하였다(도 3b, 상부 2개 행, 제3열 및 제4열 대 제2열). 그러나, 재발된 샘플들 둘다에서 일부 증식 CLL 세포들은 유지되었다(도 3b, 하부 2개 행, 제2열, 제3열 및 제4열 대 제1열). 따라서, 이브루티닙에 대한 CLL 시험관내 증식 반응은 환자의 임상 경과와 일치하고 이브루티닙 치료에 대한 내성을 획득하였다.

[0339] 유동 세포측정에서 사용된 항체는 비디(BD)(미국 캘리포니아주 산 호세 소재)로부터 구입되어 설명서에 따라 사용되었다: CD3-V500, CD19-APCCy7, CD19-APC, CD5-PerCPCy5.5, CD5-FITC, CXCR4-PECy7, CXCR4-PE, CD38-PE, CD62L-PE, CCR7-V450, CXCR3-알렉사488, CXCR5-알렉사647, CD49d-APC, CD29-PE, CD44-V450, CD54-PE, CD11a-APC, CD11c-V450, CD18-FITC, CD40-PECy7, Ki67-알렉사488, Ig k 경쇄-APC, Ig l 경쇄-FITC. 웨스턴 블롯을 위해 사용된 항체는 다음과 같았다: ERK1 및 ERK2에 대한 인-p44/42 MAP 키나제[T202/Y204], PKB/AKT에 대한 인-AKT[Ser473](뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs), 미국 매사추세츠주 임스위치 소재), BTK에 대한 인-BTK[Y551](비디 바이오사이언시스), BTK에 대한 인-BTK[Y223](에피토크(Epitomics), 미국 캘리포니아주 버링감 소재) 및 PLC γ 2에 대한 인-PLC γ 2[Y759](비디 바이오사이언시스); 항-ERK2(C-14; 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재), 항-AKT(H-136; 산타 크루즈 바이오테크놀로지), 항-BTK(클론 53; 비디 바이오사이언시스), 염소 F(ab)'₂ 항-인간 IgM(LE/AF; 서던 바이오텍(Southern Biotech), 미국 알라바마주 버밍햄 소재), 호스라디쉬 퍼록시다제(HRP)-접합된 토끼 항-마우스 및 HRP-접합된 염소 항-토끼(다코(DAKO), 미국 텍사스주 휴스턴 소재).

[0340] **실시예 6**

[0341] 본 실시예는 BCR 또는 대안적 경로의 다른 억제제가 CLL 증식을 억제할 수 있고 C481S 돌연변이에 의해 야기된 내성을 무효화할 수 있다는 것을 입증한다. 시험관내 CLL 증식 모델을 사용하여 세포를 이브루티닙 이외에 GS-1101(CAL-101, PI3K델타 억제제), 다사티닙(다운스트림 BCR 표적 LYN 및 BTK), PRT062070(SYK/JAK 이중 억제제), PRT060318(고도 특이적 SYK 억제제, 기준물) 및 토파시티닙(JAK 억제제)로 처리하였다. 도 3c는 이브루티닙 및 GS-1101이 증식을 31%에서 각각 12% 및 14%까지 감소시킨 반면, 토파시티닙이 증식을 21%까지만 감소시켰다는 것을 입증한다. 다사티닙, 및 SYK에 대한 활성을 갖는 2개의 억제제(PRT062070 및 PRT060318)는 증식을 완전히 억제하였다. 이들 결과는 BTK 돌연변이를 갖는 CLL 세포가 BCR 억제에 대한 민감성을 유지한다는 것을 암시한다. 따라서, LYN, SYK, JAK, PI3K, PLC γ , MAPK, MEK 또는 NF κ B의 추가 또는 대안적 억제제, 다른 공유 BTK 억제제, 또는 다른 가역적 BTK 억제제도 C481S 돌연변이를 갖는 환자에서 효과적일 것으로 예상된다.

[0342] **실시예 7**

[0343] 이브루티닙 단일 또는 조합 치료의 초기 시험에는 평균 14개월 동안 이브루티닙을 제공받는 246명의 CLL 환자들 이 등록되었다. RNAseq 및 전체 엑솜 서열결정(WES)에 이어서 비교 계층 분석을 기준 시점, 및 재발 또는 진행

성 질환(PD) 후에 수행하였고 이브루티닙에 대한 내성을 획득한 3명의 환자들에 대한 생거 서열결정으로 확인하였다. TopHat 및 BWA 소프트웨어를 사용하여 RNAseq 및 WES 데이터를 정렬하였다. 샘플스 엠파일업(SAMtools mpileup)을 사용하여 단일 뉴클레오타이드 변경들(SNV들)을 확인하였다. 통상적인 화학치료로부터 재발된 환자와 비교될 때, 최소한의 게놈 변화가 이브루티닙 내성 환자에서 획득되었는데, 이것은 상대적인 게놈 안정성을 반영한다. 3명의 환자들에서 재발 샘플에 특이적인 SNV들이 발견되었다. 3명의 환자들 중 2명의 환자들은 BTK의 위치 481에서 세린으로의 시스테인의 치환(C481S)을 각각 코딩하는 상이한 SNV들을 가졌다. BMX, ITK, TEC 및 BLK에서의 상동성 시스테인 잔기들은 야생형(WT)이었다. 이브루티닙은 WT보다 25배 덜 강력하게 재조합 C481S를 억제하였고 세포에서 발현된 C481S에 공유결합할 수 없었다. 세 번째 환자는 WT BTK를 가졌지만, BTK의 기질인 PLC γ 2의 엑손 19에서 R665W 치환을 코딩하는 잠재적인 기능 획득 돌연변이인 c1993t를 획득하였는데, 이것은 항시적 PLC γ 2 활성화와 일치하였다.

[0344]

초기에 이브루티닙에 반응한 후 나중에 약물 내성을 나타내게 된 환자들의 후속 연구에서, 2종의 추가 돌연변이가 확인되었다. 핵산 서열결정은 치료 시작 시 채취된 환자 혈액 샘플이 야생형을 나타낸 반면, 의사에 의해 질환 진행으로 지정되었을 때 채취된 샘플이 하기 부위들에서 돌연변이되었다는 것을 보여주었다: 1) 1명의 환자는 PLC γ 2에서 돌연변이를 획득한 것으로 발견되었다. 상기 돌연변이는 인-프레임 단일 뉴클레오타이드 점 돌연변이이다: c2120t(즉, PLC γ 2 코딩 영역의 사이토신 대신에 위치 2120에서의 티민). 상기 돌연변이는 코돈 707에서 페닐알라닌으로의 세린의 치환(S707F)을 갖는 PLC γ 2 단백질을 발생시킨다. 2) 1명의 환자는 CARD11에서 돌연변이를 획득한 것으로 발견되었다. 상기 돌연변이는 CARD11 코딩 영역의 뉴클레오타이드 위치 694와 695 사이의 3개 티민 뉴클레오타이드의 삽입이다. 상기 돌연변이는 694_695insTTT로서 명명되었다. 상기 돌연변이는 류신-232와 라이신-233 사이에서 류신 코돈의 삽입을 갖는 CARD11 단백질을 발생시킨다. 상기 돌연변이체는 L232_K233insL 또는 L232LL로서 지칭된다. (CARD11 mRNA의 번역을 위한 대안적 시작 부위가 존재한다는 것을 주목한다. 일부 경우, 이 부위에서의 CARD11 돌연변이는 232 대신에 위치 225로서 표시된다).

[0345]

S707F 돌연변이는 PLC γ 2 단백질의 항시적 활성을 초래하는 기능 획득 돌연변이일 것으로 예상된다. PLC γ 2에서의 유사한 돌연변이(S707Y)가 문헌(Zhou et al. in American Journal of Human Genetics (2012) 91: 713-720)에 기재되었고, PLC γ 2 단백질에 항시적 활성을 부여하고, 자가면역 및 면역결핍 질환을 초래한다. R665W 돌연변이처럼 S707F도 자가억제 카복실-말단 SH2 도메인에 존재한다. PLC γ 2가 BTK의 다운스트림에 있다는 점을 고려할 때, 기능 획득 항시적 PLC γ 2 활성을 부여하는 효과는 이브루티닙에 대한 약물 내성을 뒷받침한다.

[0346]

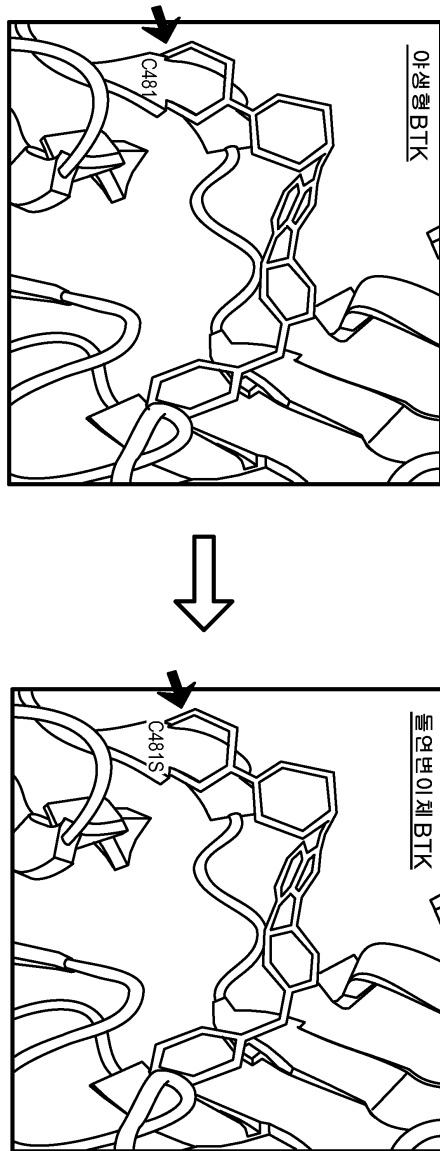
CARD11 L232LL 돌연변이체 단백질도 항시적 활성을 가질 것으로 예상된다. 유사한 돌연변이가 문헌(Lenz et al. in Science (2008) 319: 1676-1679)에 기재된 바와 같이 B 세포 림프종 환자 샘플에서 발견되었다(232와 233 사이의 이소류신 삽입). 상기 문헌(Lenz et al.)에 기재된 바와 같이, 상기 돌연변이는 다운스트림 NF-kB 경로의 항시적 활성을 부여하고 세포 생존을 향상시켰다. PLC γ 2처럼 CARD11도 BTK의 활성화된 다운스트림 단백질이다. CARD11은 BTK 및 PLC γ 2의 다운스트림 이펙터인 PKC β 에 의해 인산화되고 활성화된다. 따라서, 항시적 활성을 부여하는 CARD11의 기능 획득 돌연변이는 BTK를 우회할 수 있고 BTK 억제제, 예컨대, 이브루티닙의 존재 하에서 세포가 성장 및 항-아포토시스 신호전달 경로를 활성화시킬 수 있게 한다. L232LL 돌연변이는 CARD11 올리고머화 및 NF-kB 활성화에 중요한 아미노-말단 코일드-코일 도메인에 존재하고, 이때 CARD11의 여러 상이한 돌연변이들이 B 세포 림프종 환자 표본에서 발견되었다.

[0347]

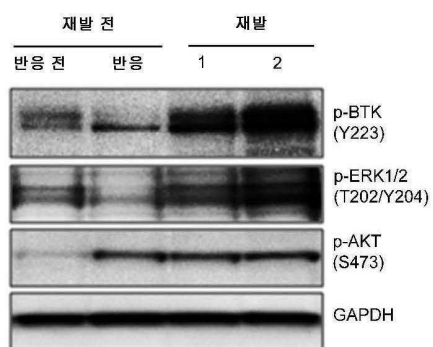
본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 예시 목적으로만 제공되고, 당업자에게 암시된 다양한 변경 또는 변화가 본원의 사상 및 범주, 및 첨부된 특허청구범위 내에 포함된다.

도면

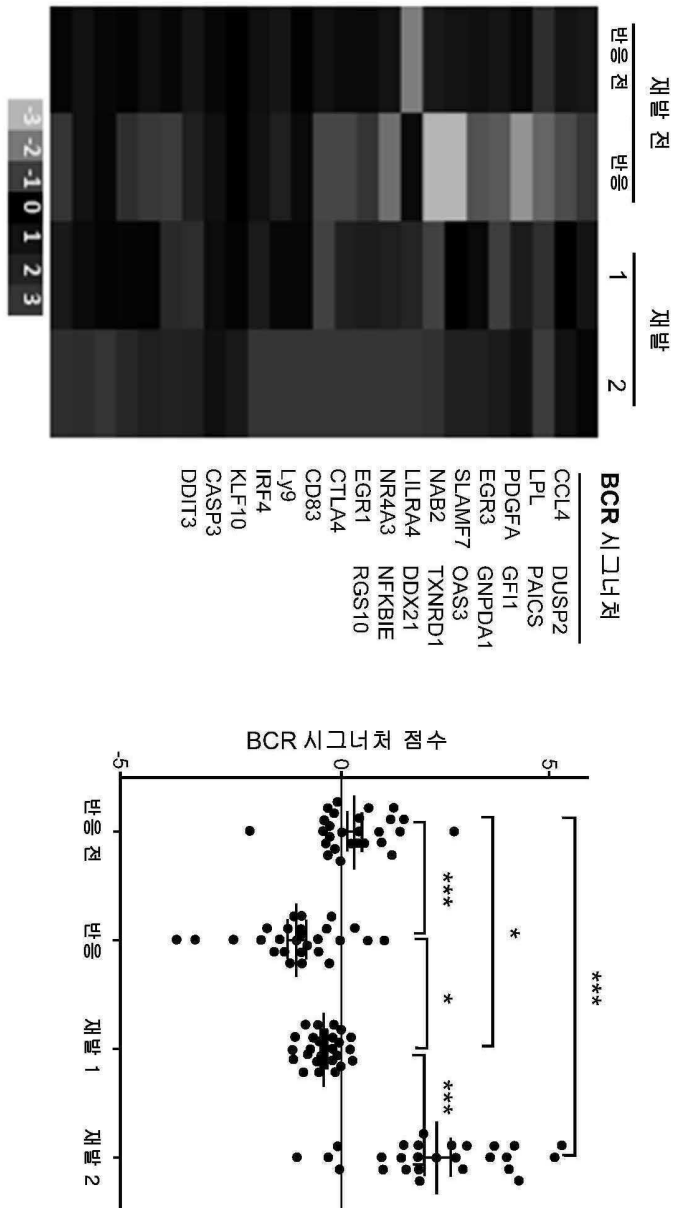
도면1



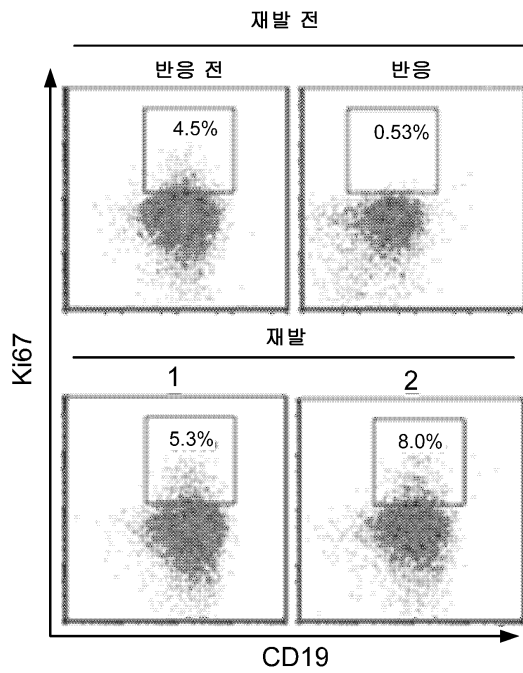
도면2a



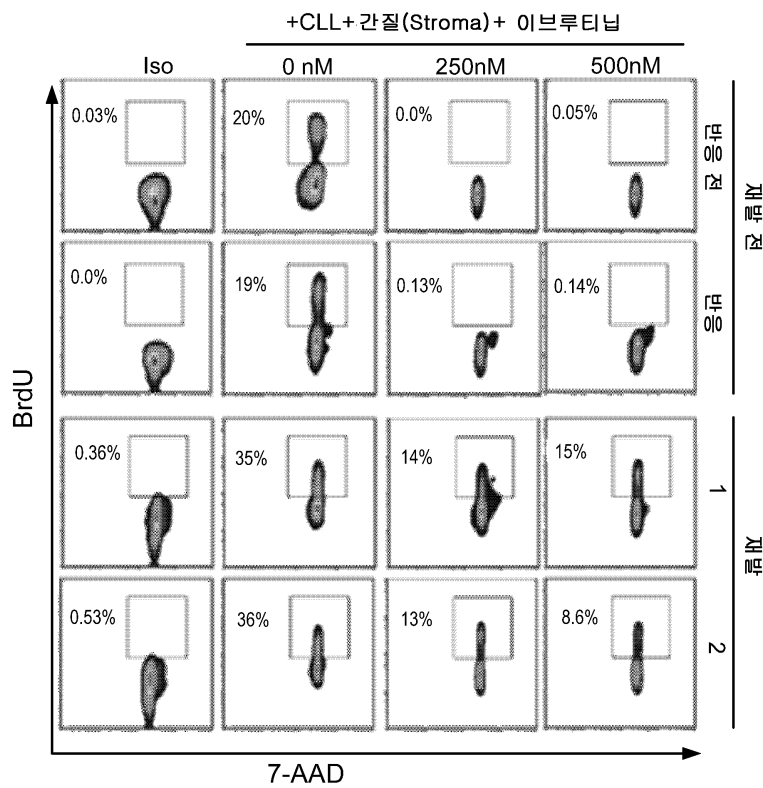
도면2b



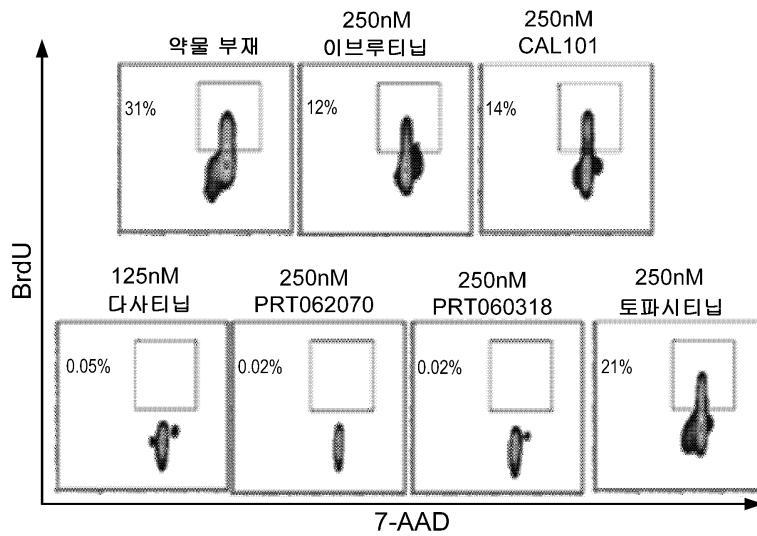
도면3a



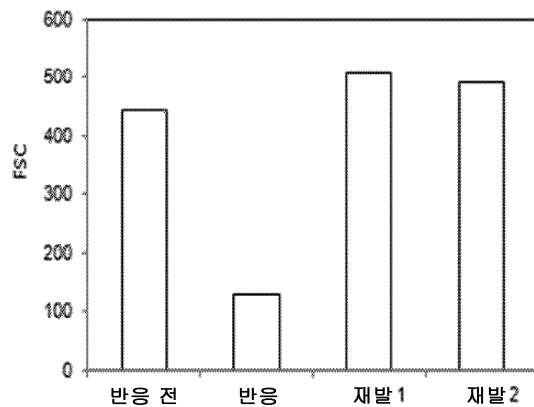
도면3b



도면3c



도면4



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pharmacyclics, Inc

Chang, Betty Y.

Buggy, Joseph J.

Steggerda, Susanne M.

<120> MUTATIONS ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO INHIBITORS OF BRUTON'S
TYROSINE KINASE (BTK)

<130> 25922-865.601

<150> US 61/675,303

<151> 2012-07-24

<150> US 61/682,688

<151> 2012-08-13

<150> US 61/780,652

<151> 2013-03-13

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 659

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys

145 150 155 160

Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys

165	170	175
Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr	Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro	
180	185	190
Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Ala		
195	200	205
Ala Pro Val Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp		
210	215	220
Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Asp Glu		
225	230	235
240		
Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp		
245	250	255
Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu Ala		
260	265	270
Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg		
275	280	285
Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe		
290	295	300
Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe		
305	310	315
320		
Ala Lys Ser Thr Gly Asp Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val		
325	330	335
Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe		
340	345	350
Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly		
355	360	365
Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Gln Gln Asn Lys Asn Ala		
370	375	380
Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys		
385	390	395
400		
Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val		
405	410	415

Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile
420 425 430

Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val
435 440 445

Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys
450 455 460

Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly
465 470 475 480

Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln
485 490 495

Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu
500 505 510

Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu
515 520 525

Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg
530 535 540

Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro
545 550 555 560

Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser
565 570 575

Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser
580 585 590

Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu
595 600 605

His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu
610 615 620

Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu
625 630 635 640

Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp
645 650 655

Glu Glu Ser

<210> 2

<211> 659

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Val Pro Glu Lys Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85 90 95

Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr

100 105 110

Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu

115 120 125

Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro

130 135 140

Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys

145 150 155 160

Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys

165 170 175

Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro

180 185 190

Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Ala

195 200 205

Ala Pro Val Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp
210 215 220
Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Asp Glu
225 230 235 240
Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp
245 250 255
Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu Ala
260 265 270
Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg
275 280 285
Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe
290 295 300
Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe
305 310 315 320
Ala Lys Ser Thr Gly Asp Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val
325 330 335
Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe
340 345 350
Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly
355 360 365
Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Gln Gln Asn Lys Asn Ala
370 375 380
Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys
385 390 395 400
Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val
405 410 415
Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile
420 425 430
Lys Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val
435 440 445
Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys

450 455 460
 Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly
 465 470 475 480
 Ser Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln

 485 490 495
 Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu
 500 505 510
 Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu
 515 520 525
 Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg
 530 535 540
 Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro

 545 550 555 560
 Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser
 565 570 575
 Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser
 580 585 590
 Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu
 595 600 605
 His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu

 610 615 620
 Lys Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu
 625 630 635 640
 Arg Pro Thr Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp
 645 650 655
 Glu Glu Ser

<210> 3

<211> 2611

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aactgagtgg ctgtgaaagg gtggggtttg ctcagactgt ccttcctctc tggactgtaa	60
gaatatgtct ccagggccag tgtctgtctg gatcgagtcc caccttccaa gtcctggcat	120
ctcaatgcat ctgggaagct acctgcatta agtcaggact gagcacacag gtgaactcca	180
gaaaagaaga gctatggccg cagtgttctt ggagagcatc tttctgaagc gatcccaaca	240
gaaaaagaaa acatcacctc taaacttcaa gaagcgctg tttctcttga ccgtgcacaa	300
actctcctac tatgagtatg actttgaacg tgggagaaga ggcagtaaga agggttcaat	360
agatgttgag aagatcactt gtgttgaac agtggttcct gaaaaaaatc ctctccaga	420
aagacagatt ccgagaagag gtgaagagtc cagtgaatg gagcaaattt caatcattga	480
aaggttcctt tatcccttcc aggttgtata tgatgaaggg cctctctacg tcttctcccc	540
aactgaagaa ctaaggaagc ggtggattca ccagctcaaa aacgtaatcc ggtacaacag	600
tgatctggtt cagaaatata acccttgctt ctggatcgat gggcagatc tctgtctctc	660
tcagacagcc aaaaatgcta tgggctgcca aattttggag aacaggaatg gaagcttaaa	720
acctgggagt tctcacgga agacaaaaaa gcctcttccc ccaacgcctg aggaggacca	780
gatcttgaat aagccactac cgcttgagcc agcagcagca ccagtctcca caagtgagct	840
gaaaaaggtt gtggcccttt atgattacat gccaatgaat gcaaatgac tacagctgcg	900
gaagggtgat gaatatttta tcttgaggga aagcaactta ccatggtgga gagcacgaga	960
taaaaatggg caggaaggct acattcctag taactatgtc actgaagcag aagactccat	1020
agaaatgtat gattggtatt ccaaacacat gactcggagt caggctgagc aactgctaaa	1080
gcaagagggg aaagaaggag gtttcattgt cagagactcc agcaaagctg gcaaatatac	1140
agtgtctgtg tttgctaaat ccacagggga ccctcaaggg gtgatacgtc attatgttgt	1200
gtgttccaca cctcagagcc agtattacct ggctgagaag caccttttca gcaccatccc	1260
tgagctcatt aactaccatc agcacaactc tgcaggactc atatccaggc tcaaatatcc	1320
agtgtctcaa caaacaaga atgcaccttc cactgcaggc ctgggatcgc gatcatggga	1380
aattgatcca aaggacctga ccttcttgaa ggagctgggg actggacaat ttgggtagt	1440
gaagtatggg aaatggagag gccagtacga cgtggccatc aagatgatca aagaaggctc	1500
catgtctgaa gatgaattca ttgaagaagc caaagtcatt atgaatcttt cccatgagaa	1560
gctggtgcag ttgtatggcg tctgcaccaa gcagcgcccc atcttcatca tcaactgagta	1620
catggccaat ggctgcctcc tgaactacct gaggagatg cgccaccgct tccagactca	1680
gcagctgcta gagatgtgca aggatgtctg tgaagccatg gaatacctgg agtcaaagca	1740

gttccttcac cgagacctgg cagctcgaaa ctgtttggta aacgatcaag gagtgtttaa 1800

agtatctgat ttcggcctgt ccaggtatgt cctggatgat gaatacacia gctcagtagg 1860

ctccaaattt ccagtcgggt ggtccccacc ggaagtctg atgtatagca agttcagcag 1920

caaatctgac atttgggctt ttggggtttt gatgtgggaa atttactccc tggggaagat 1980

gccatatgag agatttacta acagttagac tgcagaacac attgccaag gcctacgtct 2040

ctacaggcct catctggctt cagagaaggt atataccatc atgtacagtt gctggcatga 2100

gaaagcagat gagcgtccca ctttcaaat tcttctgagc aatattctag atgtcatgga 2160

tgaagaatcc tgagctcgcc aataagcttc ttggtttctac ttctcttctc cacaagcccc 2220

aatttcactt tctcagagga aatcccaagc ttaggagccc tggagccttt gtgctccac 2280

tcaatacaaa aagccccctc tctacatctg ggaatgcacc tcttctttga ttccttgga 2340

tagtggcttc tgagcaaagg ccaagaaatt attgtgcctg aaatttcccg agagaattaa 2400

gacagactga atttgcgatg aaaatatattt ttaggaggga ggatgtaaat agccgcacaa 2460

aggggtccaa cagctctttg agtaggcatt tggtagagct tgggggtgtg tgtgtggggg 2520

tggaccgaat ttggcaagaa tgaatggtg tcataaagat gggaggggag ggtgttttga 2580

taaaataaaa ttactagaaa gcttgaaagt c 2611

<210> 4

<211> 659

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15

Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu

20 25 30

Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg

35 40 45

Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Ile Asp Val Glu Lys Ile Thr Cys Val

50 55 60

Glu Thr Val Ile Pro Glu Lys Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Ile Pro

65 70 75 80

Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu

85	90	95	
Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr			
100	105	110	
Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu			
115	120	125	
Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro			
130	135	140	
Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys			
145	150	155	160
Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu Lys			
165	170	175	
Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro			
180	185	190	
Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Thr Ala			
195	200	205	
Ala Pro Ile Ser Thr Thr Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asp			
210	215	220	
Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Glu Glu			
225	230	235	240
Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg Asp			
245	250	255	
Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Ile Thr Glu Ala			
260	265	270	
Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr Arg			
275	280	285	
Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe			
290	295	300	
Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Phe			
305	310	315	320
Ala Lys Ser Thr Gly Glu Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val Val			
325	330	335	

Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe
 340 345 350
 Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly
 355 360 365
 Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Lys Gln Asn Lys Asn Ala
 370 375 380
 Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys
 385 390 395 400
 Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val
 405 410 415
 Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met Ile
 420 425 430
 Arg Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys Val
 435 440 445
 Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys
 450 455 460
 Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly
 465 470 475 480
 Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr Gln
 485 490 495
 Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu
 500 505 510
 Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu
 515 520 525
 Val Asn Asp Gln Gly Val Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg
 530 535 540
 Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Pro
 545 550 555 560
 Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser Ser
 565 570 575
 Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr Ser

580 585 590
 Leu Gly Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala Glu
 595 600 605
 His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser Glu
 610 615 620
 Arg Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp Glu

625 630 635 640
 Arg Pro Ser Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met Asp
 645 650 655
 Glu Glu Ser

<210> 5

<211> 657

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<400> 5

Met Ala Ser Ile Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln
 1 5 10 15
 Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu
 20 25 30

Thr Glu Ser Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Arg
 35 40 45
 Arg Gly Ser Lys Lys Gly Ser Val Asp Ile Glu Lys Ile Thr Cys Val
 50 55 60
 Glu Thr Val Val Pro Glu Asn Asn Pro Pro Pro Glu Arg Gln Val Pro
 65 70 75 80
 Lys Lys Gly Glu Asp Tyr Asn Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile Glu Arg
 85 90 95

Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu Tyr Val
 100 105 110
 Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln Leu Lys
 115 120 125

Ser Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His Pro Cys
130 135 140

Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala Lys Asn
145 150 155 160

Ala Met Gly Cys Lys Ile Leu Glu Ser Arg Asn Gly Ser Leu Lys Ala
165 170 175

Gly Arg Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr Pro Glu
180 185 190

Glu Asp Thr Met Val Met Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Ala Pro Ser
195 200 205

Ala Ala Gly Glu Met Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr Asn Tyr Val Pro
210 215 220

Met Asn Val Gln Asp Leu Gln Leu Gln Lys Gly Glu Asp Tyr Leu Ile
225 230 235 240

Leu Glu Glu Ser His Leu Pro Trp Trp Lys Ala Arg Asp Lys Asn Gly
245 250 255

Arg Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Ala Thr Ser Asn Ser
260 265 270

Leu Glu Ile Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys Asn Ile Thr Arg Ser Gln Ala
275 280 285

Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly Phe Ile Val Arg
290 295 300

Asp Ser Thr Ser Lys Thr Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val Tyr Ala Lys
305 310 315 320

Ser Ala Val Asp Pro Gln Gly Met Ile Arg His Tyr Val Val Cys Cys
325 330 335

Thr Pro Gln Asn Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu Phe Asn Thr
340 345 350

Ile Pro Glu Leu Ile Thr Tyr His Gln His Asn Ser Ala Gly Leu Ile
355 360 365

Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Arg His Gln Lys Ser Ala Pro Ser

370 375 380
 Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro Lys Asp Leu
 385 390 395 400
 Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val Val Lys Tyr
 405 410 415

 Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asn Val Ala Ile Lys Met Ile Arg Glu
 420 425 430
 Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Asp Glu Ala Lys Val Met Met
 435 440 445
 Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val Cys Thr Lys
 450 455 460
 Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn Gly Cys Leu
 465 470 475 480

 Leu Asn Phe Leu Arg Glu Thr Gln Arg Arg Phe Gln Pro Ala Glu Leu
 485 490 495
 Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr Leu Glu Ser
 500 505 510
 Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Leu Val Asn
 515 520 525
 Asp Gln Gly Ile Val Lys Val Ser Asp Phe Gly Leu Ser Arg Tyr Val
 530 535 540

 Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Met Gly Ser Lys Phe Pro Val Arg
 545 550 555 560
 Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Leu Tyr Ser Lys Phe Ser Ser Lys Ser
 565 570 575
 Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Val Tyr Ser Leu Gly
 580 585 590
 Lys Met Pro Tyr Glu Arg Phe Asn Asn Ser Glu Thr Thr Glu His Val
 595 600 605

 Ile Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro Gln Gln Ala Ser Glu Arg Val
 610 615 620

Tyr Ala Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Glu Glu Arg Pro
 625 630 635 640
 Thr Phe Ser Ala Leu Leu Gly Ser Ile Val Asp Ile Thr Asp Glu Glu
 645 650 655
 Pro

<210> 6

<211> 660

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Ala Ala Val Ile Leu Glu Ser Ile Phe Leu Lys Arg Ser Gln Gln

1 5 10 15
 Lys Lys Lys Thr Ser Pro Leu Asn Phe Lys Lys Arg Leu Phe Leu Leu
 20 25 30
 Thr Val His Lys Leu Ser Tyr Tyr Glu Tyr Asp Phe Glu Arg Gly Gly
 35 40 45
 Arg Gly Cys Thr Phe His Phe Leu Asp Val Glu Asn Tyr Tyr Cys Val
 50 55 60
 Glu Asn Ile Leu Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Leu Ser Ser

65 70 75 80
 Lys Arg Arg Gly Glu Glu Ser Ser Glu Met Glu Gln Ile Ser Ile Ile
 85 90 95
 Glu Arg Phe Pro Tyr Pro Phe Gln Val Val Tyr Asp Glu Gly Pro Leu
 100 105 110
 Tyr Val Phe Ser Pro Thr Glu Glu Leu Arg Lys Arg Trp Ile His Gln
 115 120 125
 Leu Lys Asn Val Ile Arg Tyr Asn Ser Asp Leu Val Gln Lys Tyr His

130 135 140
 Pro Cys Phe Trp Ile Asp Gly Gln Tyr Leu Cys Cys Ser Gln Thr Ala
 145 150 155 160
 Lys Asn Ala Met Gly Cys Gln Ile Leu Glu Asn Arg Asn Gly Ser Leu

165 170 175
 Lys Pro Gly Ser Ser His Arg Lys Thr Lys Lys Pro Leu Pro Pro Thr
 180 185 190
 Pro Glu Glu Asp Gln Ile Leu Lys Lys Pro Leu Pro Pro Glu Pro Thr

 195 200 205
 Ala Ala Pro Ile Ser Thr Ser Glu Leu Lys Lys Val Val Ala Leu Tyr
 210 215 220
 Asp Tyr Met Pro Met Asn Ala Asn Asp Leu Gln Leu Arg Lys Gly Glu
 225 230 235 240
 Glu Tyr Phe Ile Leu Glu Glu Ser Asn Leu Pro Trp Trp Arg Ala Arg
 245 250 255
 Asp Lys Asn Gly Gln Glu Gly Tyr Ile Pro Ser Asn Tyr Val Thr Glu

 260 265 270
 Ala Glu Asp Ser Ile Glu Met Tyr Glu Trp Tyr Ser Lys His Met Thr
 275 280 285
 Arg Ser Gln Ala Glu Gln Leu Leu Lys Gln Glu Gly Lys Glu Gly Gly
 290 295 300
 Phe Ile Val Arg Asp Ser Ser Lys Ala Gly Lys Tyr Thr Val Ser Val
 305 310 315 320
 Phe Ala Lys Ser Thr Gly Glu Pro Gln Gly Val Ile Arg His Tyr Val

 325 330 335
 Val Cys Ser Thr Pro Gln Ser Gln Tyr Tyr Leu Ala Glu Lys His Leu
 340 345 350
 Phe Ser Thr Ile Pro Glu Leu Ile Asn Tyr His Gln His Asn Ser Ala
 355 360 365
 Gly Leu Ile Ser Arg Leu Lys Tyr Pro Val Ser Lys Gln Asn Lys Asn
 370 375 380
 Ala Pro Ser Thr Ala Gly Leu Gly Tyr Gly Ser Trp Glu Ile Asp Pro

 385 390 395 400
 Lys Asp Leu Thr Phe Leu Lys Glu Leu Gly Thr Gly Gln Phe Gly Val
 405 410 415

Val Lys Tyr Gly Lys Trp Arg Gly Gln Tyr Asp Val Ala Ile Lys Met
420 425 430

Ile Arg Glu Gly Ser Met Ser Glu Asp Glu Phe Ile Glu Glu Ala Lys
435 440 445

Val Met Met Asn Leu Ser His Glu Lys Leu Val Gln Leu Tyr Gly Val
450 455 460

Cys Thr Lys Gln Arg Pro Ile Phe Ile Ile Thr Glu Tyr Met Ala Asn
465 470 475 480

Gly Cys Leu Leu Asn Tyr Leu Arg Glu Met Arg His Arg Phe Gln Thr
485 490 495

Gln Gln Leu Leu Glu Met Cys Lys Asp Val Cys Glu Ala Met Glu Tyr
500 505 510

Leu Glu Ser Lys Gln Phe Leu His Arg Asp Leu Leu Asp Arg Asp Ser
515 520 525

Lys Lys Glu Asn Arg Gly Phe Val Lys Ser Arg Asp Phe Asp Ser Gly
530 535 540

Arg Tyr Val Leu Asp Asp Glu Tyr Thr Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe
545 550 555 560

Pro Val Arg Trp Ser Pro Pro Glu Val Leu Met Tyr Ser Lys Phe Ser
565 570 575

Ser Lys Ser Asp Ile Trp Ala Phe Gly Val Leu Met Trp Glu Ile Tyr
580 585 590

Ser Leu Gly Lys Ile Pro Tyr Glu Arg Phe Thr Asn Ser Glu Thr Ala
595 600 605

Glu His Ile Ala Gln Gly Leu Arg Leu Tyr Arg Pro His Leu Ala Ser
610 615 620

Asp Arg Val Tyr Thr Ile Met Tyr Ser Cys Trp His Glu Lys Ala Asp
625 630 635 640

Glu Arg Pro Ser Phe Lys Ile Leu Leu Ser Asn Ile Leu Asp Val Met
645 650 655

Asp Glu Glu Ser

660

<210> 7

<211> 1980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggccgcag tgattctgga gagcatcttt ctgaagcgat cccaacagaa aaagaaaaca	60
tcacctctaa acttcaagaa ggcctgttt ctcttgaccg tgcacaaact ctctactat	120
gagtatgact ttgaacgtgg gagaagaggc agtaagaagg gttcaataga tgttgagaag	180
atcacttgtg ttgaacagtg ggttcctgaa aaaaatctc ctccagaaag acagattccg	240
agaagagggtg aagagtcag tgaaatggag caaatctca tcattgaaag gttcccttat	300
cccttcagg ttgtatatga tgaaggcct ctctacgtct tctcccaac tgaagaacta	360
aggaagcggg ggattcacca gctcaaaaac gtaatccggg acaacagtga tctgggtcag	420
aaatatcacc cttgcttctg gatcgatggg cagtatctct gctgctctca gacagccaaa	480
aatgctatgg gctgccaaat ttgggagaac aggaatggaa gcttaaaacc tgggagttct	540
caccggaaga caaaaaagcc tcttcccca acgcctgagg aggaccagat cttgaaaaag	600
ccactaccgc ctgagccagc agcagcacca gtctccaca gtgagctgaa aaaggttgtg	660
gccctttatg attacatgcc aatgaatgca aatgatctac agctgcggaa gggatgatgaa	720
tattttatct tggaggaaag caacttacca tggaggagag cacgagataa aaatgggcag	780
gaaggctaca ttctagtaa ctatgtcact gaagcagaag actccataga aatgtatgag	840
tggatttcca aacacatgac tcggagtcag gctgagcaac tgctaaagca agaggggaaa	900
gaaggagggtt tcattgtcag agactccagc aaagctggca aatatacagt gtctgtgttt	960
gctaaatcca caggggaccc tcaaggggtg atacgtcatt atgttgtgtg ttccacacct	1020
cagagccagt attacctggc tgagaagcac cttttcagca ccatccctga gtcattaac	1080
taccatcagc acaactctgc aggactcata tccaggctca aatatccagt gtctcaacaa	1140
aacaagaatg caccttcac tgcaggcctg ggatacggat catgggaaat tgatccaaag	1200
gacctgacct tcttgaagga gctggggact ggacaatttg gggtagtgaa gtatgggaaa	1260
tggagaggcc agtacgact ggccatcaag atgatcaaag aaggctccat gtctgaagat	1320
gaattcattg aagaagccaa agtcatgatg aatctttccc atgagaagct ggtgcagttg	1380
tatggcgtct gcaccaagca gcgccccatc ttcacatca ctgagtacat ggccaatggc	1440
agcctctga actacctgag ggagatgcgc caccgttcc agactcagca gctgctagag	1500

atgtgcaagg atgtctgtga agccatggaa tacctggagt caaagcagtt ccttcaccga 1560

gacctggcag ctgaaactg tttggtaaac gatcaaggag ttgttaaagt atctgatttc 1620

ggcctgtcca ggtatgtcct ggatgatgaa tacacaagct cagtaggctc caaatctcca 1680

gtccgggtgg cccaccgga agtcctgatg tatagcaagt tcagcagcaa atctgacatt 1740

tgggcttttg gggttttgat gtgggaaatt tactccctgg ggaagatgcc atatgagaga 1800

tttactaaca gtgagactgc tgaacacatt gcccaaggcc tacgtctcta caggcctcat 1860

ctggcttcag agaaggtata taccatcatg tacagttgtt ggcatgagaa agcagatgag 1920

cgtcccactt tcaaaattct tctgagcaat attctagatg tcatggatga agaactctga 1980

<210> 8

<211> 1980

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

atggccgcag tgattctgga gagcatcttt ctgaagcgat cccaacagaa aaagaaaaca 60

tcacctctaa acttcaagaa ggcctgttt ctcttgaccg tgcacaaact ctctactat 120

gagtatgact ttgaacgtgg gagaagaggc agtaagaagg gttcaataga tgttgagaag 180

atcactttgt ttgaacaggt gggtcctgaa aaaaatcctc ctccagaaag acagattccg 240

agaagagggt aagagtcag tgaatggag caaatctcaa tcattgaaag gttcccttat 300

cccttcagg ttgtatatga tgaagggcct ctctacgtct tctcccaac tgaagaacta 360

aggaagcggg ggattcacca gctcaaaaac gtaatccggg acaacagtga tctggttcag 420

aaatatcacc cttgcttctg gatcgatggg cagtatctct gctgctctca gacagccaaa 480

aatgctatgg gctgccaaat tttggagaac aggaatggaa gcttaaaacc tgggagttct 540

caccggaaga caaaaaagcc tcttcccca acgcctgagg aggaccagat cttgaaaaag 600

ccactaccgc ctgagccagc agcagcacca gtctccaca gtgagctgaa aaaggttgtg 660

gccctttatg attacatgcc aatgaatgca aatgatctac agctgcgga gggatgatgaa 720

tattttatct tggaggaaag caacttacca tgggtggagag cacgagataa aaatgggcag 780

gaaggctaca ttctagtaa ctatgtcact gaagcagaag actccataga aatgtatgag 840

tggatttcca aacacatgac tcggagtcag gctgagcaac tgctaaagca agaggggaaa 900

gaaggagggt tcattgtcag agactccagc aaagctggca aatatacagt gtctgtgttt 960

gctaaatcca caggggaccc tcaaggggtg atacgtcatt atgttgtgtg ttccacacct 1020

cagagccagt attacctggc tgagaagcac cttttcagca ccatccctga gctcattaac 1080

taccatcagc acaactctgc aggactcata tccaggctca aatatccagt gtctcaacaa 1140
aacaagaatg caccttccac tgcaggcctg ggatacggat catgggaaat tgatccaaag 1200

gacctgacct tcttgaagga gctggggact ggacaatttg gggtagttaa gtatgggaaa 1260
tggagaggcc agtacgacgt ggccatcaag atgatcaaag aaggctccat gtctgaagat 1320
gaattcattg aagaagccaa agtcatgatg aatctttccc atgagaagct ggtgcagttg 1380
tatggcgtct gcaccaagca gcgccccatc ttcacatca ctgagtacat ggccaatggc 1440
tccctcctga actacctgag ggagatgcgc caccgcttcc agactcagca gctgctagag 1500
atgtgcaagg atgtctgtga agccatggaa tacctggagt caaagcagtt ccttcaccga 1560
gacctggcag ctgaaactg tttggtaaac gatcaaggag ttgttaaagt atctgatttc 1620

ggcctgtcca ggtatgtcct ggatgatgaa tacacaagct cagtaggctc caaatttcca 1680
gtccggtggt cccaccgga agtcctgatg tatagcaagt tcagcagcaa atctgacatt 1740
tgggcttttg gggttttgat gtgggaaatt tactccctgg ggaagatgcc atatgagaga 1800
tttactaaca gtgagactgc tgaacacatt gcccaaggcc tacgtctcta caggcctcat 1860
ctggcttcag agaaggtata taccatcatg tacagttgct ggcatgagaa agcagatgag 1920
cgtcccactt tcaaaattct tctgagcaat attctagatg tcatggatga agaatcctga 1980

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 9

aagtgaattt ggggcttgtg 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 10

agtccacact tccaagtcct 20

<210> 11

<211> 1265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Thr Thr Val Asn Val Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Glu Lys Ser

1 5 10 15

Gln Ile Lys Arg Ala Leu Glu Leu Gly Thr Val Met Thr Val Phe Ser

20 25 30

Phe Arg Lys Ser Thr Pro Glu Arg Arg Thr Val Gln Val Ile Met Glu

35 40 45

Thr Arg Gln Val Ala Trp Ser Lys Thr Ala Asp Lys Ile Glu Gly Phe

50 55 60

Leu Asp Ile Met Glu Ile Lys Glu Ile Arg Pro Gly Lys Asn Ser Lys

65 70 75 80

Asp Phe Glu Arg Ala Lys Ala Val Arg Gln Lys Glu Asp Cys Cys Phe

85 90 95

Thr Ile Leu Tyr Gly Thr Gln Phe Val Leu Ser Thr Leu Ser Leu Ala

100 105 110

Ala Asp Ser Lys Glu Asp Ala Val Asn Trp Leu Ser Gly Leu Lys Ile

115 120 125

Leu His Gln Glu Ala Met Asn Ala Ser Thr Pro Thr Ile Ile Glu Ser

130 135 140

Trp Leu Arg Lys Gln Ile Tyr Ser Val Asp Gln Thr Arg Arg Asn Ser

145 150 155 160

Ile Ser Leu Arg Glu Leu Lys Thr Ile Leu Pro Leu Ile Asn Phe Lys

165 170 175

Val Ser Ser Ala Lys Phe Leu Lys Asp Lys Phe Val Glu Ile Gly Ala

180 185 190

His Lys Asp Glu Leu Ser Phe Glu Gln Phe His Leu Phe Tyr Lys Lys

195 200 205

Leu Met Phe Glu Gln Gln Lys Ser Ile Leu Asp Glu Phe Lys Lys Asp

210 215 220

Ser Ser Val Phe Ile Leu Gly Asn Thr Asp Arg Pro Asp Ala Ser Ala

225 230 235 240
 Val Tyr Leu His Asp Phe Gln Arg Phe Leu Ile His Glu Gln Gln Glu
 245 250 255
 His Trp Ala Gln Asp Leu Asn Lys Val Arg Glu Arg Met Thr Lys Phe
 260 265 270
 Ile Asp Asp Thr Met Arg Glu Thr Ala Glu Pro Phe Leu Phe Val Asp

 275 280 285
 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Phe Ser Arg Glu Asn Ser Ile Trp Asp Glu
 290 295 300
 Lys Tyr Asp Ala Val Asp Met Gln Asp Met Asn Asn Pro Leu Ser His
 305 310 315 320
 Tyr Trp Ile Ser Ser Ser His Asn Thr Tyr Leu Thr Gly Asp Gln Leu
 325 330 335
 Arg Ser Glu Ser Ser Pro Glu Ala Tyr Ile Arg Cys Leu Arg Met Gly

 340 345 350
 Cys Arg Cys Ile Glu Leu Asp Cys Trp Asp Gly Pro Asp Gly Lys Pro
 355 360 365
 Val Ile Tyr His Gly Trp Thr Arg Thr Thr Lys Ile Lys Phe Asp Asp
 370 375 380
 Val Val Gln Ala Ile Lys Asp His Ala Phe Val Thr Ser Ser Phe Pro
 385 390 395 400
 Val Ile Leu Ser Ile Glu Glu His Cys Ser Val Glu Gln Gln Arg His

 405 410 415
 Met Ala Lys Ala Phe Lys Glu Val Phe Gly Asp Leu Leu Leu Thr Lys
 420 425 430
 Pro Thr Glu Ala Ser Ala Asp Gln Leu Pro Ser Pro Ser Gln Leu Arg
 435 440 445
 Glu Lys Ile Ile Ile Lys His Lys Lys Leu Gly Pro Arg Gly Asp Val
 450 455 460
 Asp Val Asn Met Glu Asp Lys Lys Asp Glu His Lys Gln Gln Gly Glu

 465 470 475 480

Leu Tyr Met Trp Asp Ser Ile Asp Gln Lys Trp Thr Arg His Tyr Cys
 485 490 495
 Ala Ile Ala Asp Ala Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Ile Glu Gln Thr
 500 505 510
 Met Glu Glu Glu Val Pro Gln Asp Ile Pro Pro Thr Glu Leu His Phe
 515 520 525
 Gly Glu Lys Trp Phe His Lys Lys Val Glu Lys Arg Thr Ser Ala Glu
 530 535 540
 Lys Leu Leu Gln Glu Tyr Cys Met Glu Thr Gly Gly Lys Asp Gly Thr
 545 550 555 560
 Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Phe Pro Asn Asp Tyr Thr Leu Ser
 565 570 575
 Phe Trp Arg Ser Gly Arg Val Gln His Cys Arg Ile Arg Ser Thr Met
 580 585 590
 Glu Gly Gly Thr Leu Lys Tyr Tyr Leu Thr Asp Asn Leu Thr Phe Ser
 595 600 605
 Ser Ile Tyr Ala Leu Ile Gln His Tyr Arg Glu Thr His Leu Arg Cys
 610 615 620
 Ala Glu Phe Glu Leu Arg Leu Thr Asp Pro Val Pro Asn Pro Asn Pro
 625 630 635 640
 His Glu Ser Lys Pro Trp Tyr Tyr Asp Ser Leu Ser Arg Gly Glu Ala
 645 650 655
 Glu Asp Met Leu Met Arg Ile Pro Arg Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg
 660 665 670
 Lys Arg Glu Gly Ser Asp Ser Tyr Ala Ile Thr Phe Arg Ala Arg Gly
 675 680 685
 Lys Val Lys His Cys Arg Ile Asn Arg Asp Gly Arg His Phe Val Leu
 690 695 700
 Gly Thr Ser Ala Tyr Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Val Ser Tyr Tyr
 705 710 715 720
 Glu Lys His Ser Leu Tyr Arg Lys Met Arg Leu Arg Tyr Pro Val Thr

725	730	735	
Pro Glu Leu Leu Glu Arg Tyr Asn Met Glu Arg Asp Ile Asn Ser Leu			
740	745	750	
Tyr Asp Val Ser Arg Met Tyr Val Asp Pro Ser Glu Ile Asn Pro Ser			
755	760	765	
Met Pro Gln Arg Thr Val Lys Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Ala Lys Arg			
770	775	780	
Ser Asp Glu Leu Ser Phe Cys Arg Gly Ala Leu Ile His Asn Val Ser			
785	790	795	800
Lys Glu Pro Gly Gly Trp Trp Lys Gly Asp Tyr Gly Thr Arg Ile Gln			
805	810	815	
Gln Tyr Phe Pro Ser Asn Tyr Val Glu Asp Ile Ser Thr Ala Asp Phe			
820	825	830	
Glu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Ile Glu Asp Asn Pro Leu Gly Ser Leu			
835	840	845	
Cys Arg Gly Ile Leu Asp Leu Asn Thr Tyr Asn Val Val Lys Ala Pro			
850	855	860	
Gln Gly Lys Asn Gln Lys Ser Phe Val Phe Ile Leu Glu Pro Lys Gln			
865	870	875	880
Gln Gly Asp Pro Pro Val Glu Phe Ala Thr Asp Arg Val Glu Glu Leu			
885	890	895	
Phe Glu Trp Phe Gln Ser Ile Arg Glu Ile Thr Trp Lys Ile Asp Thr			
900	905	910	
Lys Glu Asn Asn Met Lys Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Ser Ile Ala Ile			
915	920	925	
Glu Leu Ser Asp Leu Val Val Tyr Cys Lys Pro Thr Ser Lys Thr Lys			
930	935	940	
Asp Asn Leu Glu Asn Pro Asp Phe Arg Glu Ile Arg Ser Phe Val Glu			
945	950	955	960
Thr Lys Ala Asp Ser Ile Ile Arg Gln Lys Pro Val Asp Leu Leu Lys			
965	970	975	

Tyr Asn Gln Lys Gly Leu Thr Arg Val Tyr Pro Lys Gly Gln Arg Val

980	985	990
Asp Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Phe	Arg Leu Trp Leu Cys	Gly Ser Gln
995	1000	1005
Met Val Ala Leu Asn Phe Gln	Thr Ala Asp Lys Tyr	Met Gln Met
1010	1015	1020
Asn His Ala Leu Phe Ser Leu	Asn Gly Arg Thr Gly	Tyr Val Leu
1025	1030	1035
Gln Pro Glu Ser Met Arg Thr	Glu Lys Tyr Asp Pro	Met Pro Pro
1040	1045	1050
Glu Ser Gln Arg Lys Ile Leu	Met Thr Leu Thr Val	Lys Val Leu
1055	1060	1065
Gly Ala Arg His Leu Pro Lys	Leu Gly Arg Ser Ile	Ala Cys Pro
1070	1075	1080
Phe Val Glu Val Glu Ile Cys	Gly Ala Glu Tyr Asp	Asn Asn Lys
1085	1090	1095
Phe Lys Thr Thr Val Val Asn	Asp Asn Gly Leu Ser	Pro Ile Trp
1100	1105	1110
Ala Pro Thr Gln Glu Lys Val	Thr Phe Glu Ile Tyr	Asp Pro Asn
1115	1120	1125
Leu Ala Phe Leu Arg Phe Val	Val Tyr Glu Glu Asp	Met Phe Ser
1130	1135	1140
Asp Pro Asn Phe Leu Ala His	Ala Thr Tyr Pro Ile	Lys Ala Val
1145	1150	1155
Lys Ser Gly Phe Arg Ser Val	Pro Leu Lys Asn Gly	Tyr Ser Glu
1160	1165	1170
Asp Ile Glu Leu Ala Ser Leu	Leu Val Phe Cys Glu	Met Arg Pro
1175	1180	1185
Val Leu Glu Ser Glu Glu Glu	Leu Tyr Ser Ser Cys	Arg Gln Leu
1190	1195	1200
Arg Arg Arg Gln Glu Glu Leu	Asn Asn Gln Leu Phe	Leu Tyr Asp

1205	1210	1215
Thr His Gln Asn Leu Arg Asn Ala Asn Arg Asp Ala Leu Val Lys		
1220	1225	1230
Glu Phe Ser Val Asn Glu Asn Gln Leu Gln Leu Tyr Gln Glu Lys		
1235	1240	1245
Cys Asn Lys Arg Leu Arg Glu Lys Arg Val Ser Asn Ser Lys Phe		
1250	1255	1260
Tyr Ser		
1265		
<210> 12		
<211> 4289		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 12		
agtagcgagc gccggcggcg gagggcgta gcggcgctga gtgacccgag tcgggacgcg	60	
ggctgcgcgc gcgggacccc ggagcccaaa cccggggcag gcgggcagct gtgcccgggc	120	
ggcacggcca gcttcctgat ttctcccgat tccttccttc tccttgagc ggccgacaat	180	
gtccaccacg gtcaatgtag attcccttgc ggaatatgag aagagccaga tcaagagagc	240	
cctggagctg gggacggtga tgactgtgtt cagcttcgc aagtccacc ccgagcggag	300	
aaccttcacg gtgatcatgg agacgcggca ggtggcctgg agcaagaccg ccgacaagat	360	
cgagggttc ttggatatca tggaaataaa agaaatccgc ccagggaaga actccaaaga	420	
tttcgagcga gcaaaagcag ttgccagaa agaagactgc tgcttcacca tcctatatgg	480	
cactcagttc gtcctcagca cgctcagctt ggcagctgac tctaaagg atgcagttaa	540	
ctggctctct ggcttgaata tcttacacca ggaagcgatg aatgcgtcca cccccaccat	600	
tatcgagagt tggctgagaa agcagatata ttctgtggat caaaccagaa gaaacagcat	660	
cagtctccga gaggtaaga ccatcttgcc cctgatcaac tttaaagtga gcagtgccaa	720	
gttccttaaa gataagtttg tggaaatagg agcacacaaa gatgagctca gctttgaaca	780	
gttccatctc ttctataaaa aacttatgtt tgaacagcaa aaatcgattc tcgatgaatt	840	
caaaaaggat tcgtccgtgt tcatcctggg gaacactgac aggccggatg cctctgctgt	900	
ttacctgcat gacttcaga ggttttcat acatgaacag caggagcatt gggctcagga	960	
tctgaacaaa gtcctgagc ggatgacaaa gttcattgat gacaccatgc gtgaaactgc	1020	

tgagcctttc ttgtttgtgg atgagttcct cacgtacgtg ttttcacgag aaaacagcat	1080
ctgggatgag aagtatgacg cgggtggacat gcaggacatg aacaaccccc tgtctcatta	1140
ctggatctcc tcgtcacata acacgtacct tacaggtgac cagctgcgga gcgagtcgtc	1200
cccagaagct tacatccgct gcctgcgcat gggctgtcgc tgcattgaac tggactgctg	1260
ggacgggccc gatgggaagc cggtcaccta ccatggctgg acgcggacta ccaagatcaa	1320
gtttgacgac gtcgtgcagg ccatcaaaga ccacgccttt gttacctga gcttcccagt	1380
gatcctgtcc atcgaggagc actgcagcgt ggagcaacag cgtcacatgg ccaaggcctt	1440
caaggaagta tttggcgacc tgcgttgac gaagcccacg gagccagtg ctgaccagct	1500
gcctcgtccc agccagctgc gggagaagat catcatcaag cataagaagc tgggcccccg	1560
aggcgatgtg gatgtcaaca tggaggacaa gaaggacgaa cacaagcaac agggggagct	1620
gtacatgtgg gattccattg accagaaatg gactcggcac tactgcgcca ttgccgatgc	1680
caagctgtcc ttcagtgatg acattgaaca gactatggag gaggaagtgc cccaggatat	1740
acccctaca gaactacatt ttggggagaa atggttcac aagaaggtgg agaagaggac	1800
gagtgccgag aagttgtgc aggaatactg catggagacg gggggcaagg atggcacctt	1860
cctggttcgg gagagcgaga cttccccaa tgactacacc ctgtccttct ggcggtcagg	1920
ccgggtccag cactgccgga tccgtccac catggagggc gggaccctga aatactactt	1980
gactgacaac ctacacctca gcagcatcta tgccctcacc cagcactacc gcgagacgca	2040
cctgcgtgc gccgattcg agctcggct caccggacct gtgcccaacc ccaaccccc	2100
cgagtccaag ccgtggtact atgacagcct gagccgcgga gaggcagagg acatgctgat	2160
gaggattccc cgggacgggg ctttctgat ccggaagcga gaggggagcg actcctatgc	2220
catcaccttc agggctaggg gcaaggtaaa gcattgtcgc atcaaccggg acggccggca	2280
ctttgtgtcg gggacctccg cctattttga gactctggtg gagctcgtca gttactacga	2340
gaagcattca ctctaccgaa agatgagact gcgctacccc gtgacccccg agctcctgga	2400
gcgctacaat atggaaagag atataaaact cctctacgac gtcagcagaa tgtatgtgga	2460
tcccagtga atcaatccgt ccatgcctca gagaaccgtg aaagctctgt atgactacaa	2520
agccaagcga agcgatgagc tgagcttctg ccgtggtgcc ctcatccaca atgtctccaa	2580
ggagccccgg ggctggtgga aaggagacta tggaaccagg atccagcagt acttcccatc	2640
caactacgtc gaggacatct caactgcaga cttcgaggag ctagaaaagc agattattga	2700
agacaatccc ttagggctctc ttgcagagg aatattggac ctcaatacct ataacgtcgt	2760
gaaagccct cagggaaaaa accagaagtc ctttgtcttc atcctggagc ccaagcagca	2820
ggcgatcct ccggtggagt ttgccacaga cagggtggag gagctctttg agtggtttca	2880

gagcatccga gagatcacct ggaagattga caccaaggag aacaacatga agtactggga 2940
gaagaaccag tccatcgcca tcgagctctc tgacctggtt gtctactgca aaccaaccag 3000
caaaaccaag gacaacttag aaaatcctga cttccgagaa atccgctcct ttgtggagac 3060

gaaggctgac agcatcatca gacagaagcc cgtcgacctc ctgaagtaca atcaaaaggg 3120
cctgaccgcg gtctacccaa agggacaaag agttgactct tcaaactacg accccttccg 3180
cctctggctg tgcggttctc agatgggtgc actcaatttc cagacggcag ataagtacat 3240
gcagatgaat cacgcattgt tttctctcaa tgggcgcacg ggctacgttc tgcagcctga 3300
gagcatgagg acagagaaat atgaccgat gccacccgag tcccagagga agatcctgat 3360
gacgtgaca gtcaaggttc tcggtgctcg ccctctcccc aaacttggac gaagtattgc 3420
ctgtcccttt gtagaagtgg agatctgtgg agccgagtat gacaacaaca agttcaagac 3480

gacggttgtg aatgataatg gcctcagccc tatctgggct ccaacacagg agaaggtgac 3540
atttgaaatt tatgacccaa acctggcatt tctgcgcttt gtggtttatg aagaagatat 3600
gttcagcgat cccaacttctc ttgctcatgc cacttacctt attaaagcag tcaaatcagg 3660
attcaggctc gttcctctga agaattgggt cagcgaggac atagagctgg ctccctcct 3720
ggttttctgt gagatgctgc cagtcctgga gagcgaagag gaactttact cctcctgtcg 3780
ccagctgagg aggcggcaag aagaactgaa caaccagctc tttctgtatg acacacacca 3840
gaacttgcgc aatgccaacc gggatgcctt ggttaaagag ttcagtgtta atgagaacca 3900

gctccagctg taccaggaga aatgcaacaa gaggttaaga gagaagagag tcagcaacag 3960
caagttttac tcatagaagc tggggtatgt gtgtaagggt attgtgtgtg tgcgcatgtg 4020
tgtttgcatg taggagaacg tgcctattc acactctggg aagacgctaa tctgtgacat 4080
cttttcttca agcctgcat caaggacatt tcttaagacc caactggcat gatttgggt 4140
aatttcctat tattttcatc ttggacaact ttcttaactt atattcttta tagaggattc 4200
ccaaaatgt gctcctcatt ttggcctct catgttccaa acctattga ataaaagcaa 4260
tgaaaacctt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 4289

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Oligonucleotide Primer

<400> 13

tgatgggctc caaatccctg 20

<210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide Primer
 <400> 14
 gaatgatggc accagcagc 19
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide Primer
 <400> 15
 aatccctgct tgcttcaca 20
 <210> 16
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide Primer
 <400> 16
 ttgatgggct cagcactgg 19
 <210> 17
 <211> 1265
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 Met Ser Thr Thr Val Asn Val Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Glu Lys Ser
 1 5 10 15
 Gln Ile Lys Arg Ala Leu Glu Leu Gly Thr Val Met Thr Val Phe Ser
 20 25 30
 Phe Arg Lys Ser Thr Pro Glu Arg Arg Thr Val Gln Val Ile Met Glu
 35 40 45
 Thr Arg Gln Val Ala Trp Ser Lys Thr Ala Asp Lys Ile Glu Gly Phe

50 55 60
 Leu Asp Ile Met Glu Ile Lys Glu Ile Arg Pro Gly Lys Asn Ser Lys
 65 70 75 80
 Asp Phe Glu Arg Ala Lys Ala Val Arg Gln Lys Glu Asp Cys Cys Phe
 85 90 95

 Thr Ile Leu Tyr Gly Thr Gln Phe Val Leu Ser Thr Leu Ser Leu Ala
 100 105 110
 Ala Asp Ser Lys Glu Asp Ala Val Asn Trp Leu Ser Gly Leu Lys Ile
 115 120 125
 Leu His Gln Glu Ala Met Asn Ala Ser Thr Pro Thr Ile Ile Glu Ser
 130 135 140
 Trp Leu Arg Lys Gln Ile Tyr Ser Val Asp Gln Thr Arg Arg Asn Ser
 145 150 155 160

 Ile Ser Leu Arg Glu Leu Lys Thr Ile Leu Pro Leu Ile Asn Phe Lys
 165 170 175
 Val Ser Ser Ala Lys Phe Leu Lys Asp Lys Phe Val Glu Ile Gly Ala
 180 185 190
 His Lys Asp Glu Leu Ser Phe Glu Gln Phe His Leu Phe Tyr Lys Lys
 195 200 205
 Leu Met Phe Glu Gln Gln Lys Ser Ile Leu Asp Glu Phe Lys Lys Asp
 210 215 220

 Ser Ser Val Phe Ile Leu Gly Asn Thr Asp Arg Pro Asp Ala Ser Ala
 225 230 235 240
 Val Tyr Leu Arg Asp Phe Gln Arg Phe Leu Ile His Glu Gln Gln Glu
 245 250 255
 His Trp Ala Gln Asp Leu Asn Lys Val Arg Glu Arg Met Thr Lys Phe
 260 265 270
 Ile Asp Asp Thr Met Arg Glu Thr Ala Glu Pro Phe Leu Phe Val Asp
 275 280 285

 Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Phe Ser Arg Glu Asn Ser Ile Trp Asp Glu
 290 295 300

Lys Tyr Asp Ala Val Asp Met Gln Asp Met Asn Asn Pro Leu Ser His
 305 310 315 320
 Tyr Trp Ile Ser Ser Ser His Asn Thr Tyr Leu Thr Gly Asp Gln Leu
 325 330 335
 Arg Ser Glu Ser Ser Pro Glu Ala Tyr Ile Arg Cys Leu Arg Met Gly
 340 345 350

 Cys Arg Cys Ile Glu Leu Asp Cys Trp Asp Gly Pro Asp Gly Lys Pro
 355 360 365
 Val Ile Tyr His Gly Trp Thr Arg Thr Thr Lys Ile Lys Phe Asp Asp
 370 375 380
 Val Val Gln Ala Ile Lys Asp His Ala Phe Val Thr Ser Ser Phe Pro
 385 390 395 400
 Val Ile Leu Ser Ile Glu Glu His Cys Ser Val Glu Gln Gln Arg His
 405 410 415

 Met Ala Lys Ala Phe Lys Glu Val Phe Gly Asp Leu Leu Leu Thr Lys
 420 425 430
 Pro Thr Glu Ala Ser Ala Asp Gln Leu Pro Ser Pro Ser Gln Leu Arg
 435 440 445
 Glu Lys Ile Ile Ile Lys His Lys Lys Leu Gly Pro Arg Gly Asp Val
 450 455 460
 Asp Val Asn Met Glu Asp Lys Lys Asp Glu His Lys Gln Gln Gly Glu
 465 470 475 480

 Leu Tyr Met Trp Asp Ser Ile Asp Gln Lys Trp Thr Arg His Tyr Cys
 485 490 495
 Ala Ile Ala Asp Ala Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Ile Glu Gln Thr
 500 505 510
 Met Glu Glu Glu Val Pro Gln Asp Ile Pro Pro Thr Glu Leu His Phe
 515 520 525
 Gly Glu Lys Trp Phe His Lys Lys Val Glu Lys Arg Thr Ser Ala Glu
 530 535 540

 Lys Leu Leu Gln Glu Tyr Cys Met Glu Thr Gly Gly Lys Asp Gly Thr

545 550 555 560
 Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Phe Pro Asn Asp Tyr Thr Leu Ser
 565 570 575
 Phe Trp Arg Ser Gly Arg Val Gln His Cys Arg Ile Arg Ser Thr Met
 580 585 590
 Glu Gly Gly Thr Leu Lys Tyr Tyr Leu Thr Asp Asn Leu Thr Phe Ser
 595 600 605

 Ser Ile Tyr Ala Leu Ile Gln His Tyr Arg Glu Thr His Leu Arg Cys
 610 615 620
 Ala Glu Phe Glu Leu Arg Leu Thr Asp Pro Val Pro Asn Pro Asn Pro
 625 630 635 640
 His Glu Ser Lys Pro Trp Tyr Tyr Asp Ser Leu Ser Arg Gly Glu Ala
 645 650 655
 Glu Asp Met Leu Met Arg Ile Pro Trp Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg
 660 665 670

 Lys Arg Glu Gly Ser Asp Ser Tyr Ala Ile Thr Phe Arg Ala Arg Gly
 675 680 685
 Lys Val Lys His Cys Arg Ile Asn Arg Asp Gly Arg His Phe Val Leu
 690 695 700
 Gly Thr Ser Ala Tyr Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Val Ser Tyr Tyr
 705 710 715 720
 Glu Lys His Ser Leu Tyr Arg Lys Met Arg Leu Arg Tyr Pro Val Thr
 725 730 735

 Pro Glu Leu Leu Glu Arg Tyr Asn Met Glu Arg Asp Ile Asn Ser Leu
 740 745 750
 Tyr Asp Val Ser Arg Met Tyr Val Asp Pro Ser Glu Ile Asn Pro Ser
 755 760 765
 Met Pro Gln Arg Thr Val Lys Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Ala Lys Arg
 770 775 780
 Ser Asp Glu Leu Ser Phe Cys Arg Gly Ala Leu Ile His Asn Val Ser
 785 790 795 800

Lys Glu Pro Gly Gly Trp Trp Lys Gly Asp Tyr Gly Thr Arg Ile Gln
805 810 815

Gln Tyr Phe Pro Ser Asn Tyr Val Glu Asp Ile Ser Thr Ala Asp Phe
820 825 830

Glu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Ile Glu Asp Asn Pro Leu Gly Ser Leu
835 840 845

Cys Arg Gly Ile Leu Asp Leu Asn Thr Tyr Asn Val Val Lys Ala Pro
850 855 860

Gln Gly Lys Asn Gln Lys Ser Phe Val Phe Ile Leu Glu Pro Lys Gln
865 870 875 880

Gln Gly Tyr Pro Pro Val Glu Phe Ala Thr Asp Arg Val Glu Glu Leu
885 890 895

Phe Glu Trp Phe Gln Ser Ile Arg Glu Ile Thr Trp Lys Ile Asp Thr
900 905 910

Lys Glu Asn Asn Met Lys Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Ser Ile Ala Ile
915 920 925

Glu Leu Ser Asp Leu Val Val Tyr Cys Lys Pro Thr Ser Lys Thr Lys
930 935 940

Asp Asn Leu Glu Asn Pro Asp Phe Arg Glu Ile Arg Ser Phe Val Glu
945 950 955 960

Thr Lys Ala Asp Ser Ile Ile Arg Gln Lys Pro Val Asp Leu Leu Lys
965 970 975

Tyr Asn Gln Lys Gly Leu Thr Arg Val Tyr Pro Lys Gly Gln Arg Val
980 985 990

Asp Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Phe Arg Leu Trp Leu Cys Gly Ser Gln
995 1000 1005

Met Val Ala Leu Asn Phe Gln Thr Ala Asp Lys Tyr Met Gln Met
1010 1015 1020

Asn His Ala Leu Phe Ser Leu Asn Gly Arg Thr Gly Tyr Val Leu
1025 1030 1035

Gln Pro Glu Ser Met Arg Thr Glu Lys Tyr Asp Pro Met Pro Pro

1040	1045	1050
Glu Ser Gln Arg Lys Ile Leu Met Thr Leu Thr Val Lys Val Leu		
1055	1060	1065
Gly Ala Arg His Leu Pro Lys Leu Gly Arg Ser Ile Ala Cys Pro		
1070	1075	1080
Phe Val Glu Val Glu Ile Cys Gly Ala Glu Tyr Asp Asn Asn Lys		
1085	1090	1095
Phe Lys Thr Thr Val Val Asn Asp Asn Gly Leu Ser Pro Ile Trp		
1100	1105	1110
Ala Pro Thr Gln Glu Lys Val Thr Phe Glu Ile Tyr Asp Pro Asn		
1115	1120	1125
Leu Ala Phe Leu Arg Phe Val Val Tyr Glu Glu Asp Met Phe Ser		
1130	1135	1140
Asp Pro Asn Phe Leu Ala His Ala Thr Tyr Pro Ile Lys Ala Val		
1145	1150	1155
Lys Ser Gly Phe Arg Ser Val Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Ser Glu		
1160	1165	1170
Asp Ile Glu Leu Ala Ser Leu Leu Val Phe Cys Glu Met Arg Pro		
1175	1180	1185
Val Leu Glu Ser Glu Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Cys Arg Gln Leu		
1190	1195	1200
Arg Arg Arg Gln Glu Glu Leu Asn Asn Gln Leu Phe Leu Tyr Asp		
1205	1210	1215
Thr His Gln Asn Leu Arg Asn Ala Asn Arg Asp Ala Leu Val Lys		
1220	1225	1230
Glu Phe Ser Val Asn Glu Asn Gln Leu Gln Leu Tyr Gln Glu Lys		
1235	1240	1245
Cys Asn Lys Arg Leu Arg Glu Lys Arg Val Ser Asn Ser Lys Phe		
1250	1255	1260
Tyr Ser		
1265		

<210> 18

<211> 1265

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ser Thr Thr Val Asn Val Asp Ser Leu Ala Glu Tyr Glu Lys Ser

1 5 10 15

Gln Ile Lys Arg Ala Leu Glu Leu Gly Thr Val Met Thr Val Phe Ser

20 25 30

Phe Arg Lys Ser Thr Pro Glu Arg Arg Thr Val Gln Val Ile Met Glu

35 40 45

Thr Arg Gln Val Ala Trp Ser Lys Thr Ala Asp Lys Ile Glu Gly Phe

50 55 60

Leu Asp Ile Met Glu Ile Lys Glu Ile Arg Pro Gly Lys Asn Ser Lys

65 70 75 80

Asp Phe Glu Arg Ala Lys Ala Val Arg Gln Lys Glu Asp Cys Cys Phe

85 90 95

Thr Ile Leu Tyr Gly Thr Gln Phe Val Leu Ser Thr Leu Ser Leu Ala

100 105 110

Ala Asp Ser Lys Glu Asp Ala Val Asn Trp Leu Ser Gly Leu Lys Ile

115 120 125

Leu His Gln Glu Ala Met Asn Ala Ser Thr Pro Thr Ile Ile Glu Ser

130 135 140

Trp Leu Arg Lys Gln Ile Tyr Ser Val Asp Gln Thr Arg Arg Asn Ser

145 150 155 160

Ile Ser Leu Arg Glu Leu Lys Thr Ile Leu Pro Leu Ile Asn Phe Lys

165 170 175

Val Ser Ser Ala Lys Phe Leu Lys Asp Lys Phe Val Glu Ile Gly Ala

180 185 190

His Lys Asp Glu Leu Ser Phe Glu Gln Phe His Leu Phe Tyr Lys Lys

195 200 205

Leu Met Phe Glu Gln Gln Lys Ser Ile Leu Asp Glu Phe Lys Lys Asp

210 215 220
Ser Ser Val Phe Ile Leu Gly Asn Thr Asp Arg Pro Asp Ala Ser Ala
225 230 235 240
Val Tyr Leu Arg Asp Phe Gln Arg Phe Leu Ile His Glu Gln Gln Glu
245 250 255
His Trp Ala Gln Asp Leu Asn Lys Val Arg Glu Arg Met Thr Lys Phe
260 265 270
Ile Asp Asp Thr Met Arg Glu Thr Ala Glu Pro Phe Leu Phe Val Asp

275 280 285
Glu Phe Leu Thr Tyr Leu Phe Ser Arg Glu Asn Ser Ile Trp Asp Glu
290 295 300
Lys Tyr Asp Ala Val Asp Met Gln Asp Met Asn Asn Pro Leu Ser His
305 310 315 320
Tyr Trp Ile Ser Ser Ser His Asn Thr Tyr Leu Thr Gly Asp Gln Leu
325 330 335
Arg Ser Glu Ser Ser Pro Glu Ala Tyr Ile Arg Cys Leu Arg Met Gly

340 345 350
Cys Arg Cys Ile Glu Leu Asp Cys Trp Asp Gly Pro Asp Gly Lys Pro
355 360 365
Val Ile Tyr His Gly Trp Thr Arg Thr Thr Lys Ile Lys Phe Asp Asp
370 375 380
Val Val Gln Ala Ile Lys Asp His Ala Phe Val Thr Ser Ser Phe Pro
385 390 395 400
Val Ile Leu Ser Ile Glu Glu His Cys Ser Val Glu Gln Gln Arg His

405 410 415
Met Ala Lys Ala Phe Lys Glu Val Phe Gly Asp Leu Leu Leu Thr Lys
420 425 430
Pro Thr Glu Ala Ser Ala Asp Gln Leu Pro Ser Pro Ser Gln Leu Arg
435 440 445
Glu Lys Ile Ile Ile Lys His Lys Lys Leu Gly Pro Arg Gly Asp Val

450 455 460
 Asp Val Asn Met Glu Asp Lys Lys Asp Glu His Lys Gln Gln Gly Glu

 465 470 475 480
 Leu Tyr Met Trp Asp Ser Ile Asp Gln Lys Trp Thr Arg His Tyr Cys

 485 490 495
 Ala Ile Ala Asp Ala Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Ile Glu Gln Thr

 500 505 510
 Met Glu Glu Glu Val Pro Gln Asp Ile Pro Pro Thr Glu Leu His Phe

 515 520 525
 Gly Glu Lys Trp Phe His Lys Lys Val Glu Lys Arg Thr Ser Ala Glu

 530 535 540
 Lys Leu Leu Gln Glu Tyr Cys Met Glu Thr Gly Gly Lys Asp Gly Thr

 545 550 555 560
 Phe Leu Val Arg Glu Ser Glu Thr Phe Pro Asn Asp Tyr Thr Leu Ser

 565 570 575
 Phe Trp Arg Ser Gly Arg Val Gln His Cys Arg Ile Arg Ser Thr Met

 580 585 590
 Glu Gly Gly Thr Leu Lys Tyr Tyr Leu Thr Asp Asn Leu Thr Phe Ser

 595 600 605
 Ser Ile Tyr Ala Leu Ile Gln His Tyr Arg Glu Thr His Leu Arg Cys

 610 615 620
 Ala Glu Phe Glu Leu Arg Leu Thr Asp Pro Val Pro Asn Pro Asn Pro

 625 630 635 640
 His Glu Ser Lys Pro Trp Tyr Tyr Asp Ser Leu Ser Arg Gly Glu Ala

 645 650 655
 Glu Asp Met Leu Met Arg Ile Pro Arg Asp Gly Ala Phe Leu Ile Arg

 660 665 670
 Lys Arg Glu Gly Ser Asp Ser Tyr Ala Ile Thr Phe Arg Ala Arg Gly

 675 680 685
 Lys Val Lys His Cys Arg Ile Asn Arg Asp Gly Arg His Phe Val Leu

 690 695 700

Gly Thr Phe Ala Tyr Phe Glu Ser Leu Val Glu Leu Val Ser Tyr Tyr
 705 710 715 720
 Glu Lys His Ser Leu Tyr Arg Lys Met Arg Leu Arg Tyr Pro Val Thr

 725 730 735
 Pro Glu Leu Leu Glu Arg Tyr Asn Met Glu Arg Asp Ile Asn Ser Leu
 740 745 750
 Tyr Asp Val Ser Arg Met Tyr Val Asp Pro Ser Glu Ile Asn Pro Ser
 755 760 765
 Met Pro Gln Arg Thr Val Lys Ala Leu Tyr Asp Tyr Lys Ala Lys Arg
 770 775 780
 Ser Asp Glu Leu Ser Phe Cys Arg Gly Ala Leu Ile His Asn Val Ser

 785 790 795 800
 Lys Glu Pro Gly Gly Trp Trp Lys Gly Asp Tyr Gly Thr Arg Ile Gln
 805 810 815
 Gln Tyr Phe Pro Ser Asn Tyr Val Glu Asp Ile Ser Thr Ala Asp Phe
 820 825 830
 Glu Glu Leu Glu Lys Gln Ile Ile Glu Asp Asn Pro Leu Gly Ser Leu
 835 840 845
 Cys Arg Gly Ile Leu Asp Leu Asn Thr Tyr Asn Val Val Lys Ala Pro

 850 855 860
 Gln Gly Lys Asn Gln Lys Ser Phe Val Phe Ile Leu Glu Pro Lys Gln
 865 870 875 880
 Gln Gly Tyr Pro Pro Val Glu Phe Ala Thr Asp Arg Val Glu Glu Leu
 885 890 895
 Phe Glu Trp Phe Gln Ser Ile Arg Glu Ile Thr Trp Lys Ile Asp Thr
 900 905 910
 Lys Glu Asn Asn Met Lys Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Ser Ile Ala Ile

 915 920 925
 Glu Leu Ser Asp Leu Val Val Tyr Cys Lys Pro Thr Ser Lys Thr Lys
 930 935 940
 Asp Asn Leu Glu Asn Pro Asp Phe Arg Glu Ile Arg Ser Phe Val Glu

945 950 955 960
 Thr Lys Ala Asp Ser Ile Ile Arg Gln Lys Pro Val Asp Leu Leu Lys
 965 970 975
 Tyr Asn Gln Lys Gly Leu Thr Arg Val Tyr Pro Lys Gly Gln Arg Val

 980 985 990
 Asp Ser Ser Asn Tyr Asp Pro Phe Arg Leu Trp Leu Cys Gly Ser Gln
 995 1000 1005
 Met Val Ala Leu Asn Phe Gln Thr Ala Asp Lys Tyr Met Gln Met
 1010 1015 1020
 Asn His Ala Leu Phe Ser Leu Asn Gly Arg Thr Gly Tyr Val Leu
 1025 1030 1035
 Gln Pro Glu Ser Met Arg Thr Glu Lys Tyr Asp Pro Met Pro Pro

 1040 1045 1050
 Glu Ser Gln Arg Lys Ile Leu Met Thr Leu Thr Val Lys Val Leu
 1055 1060 1065
 Gly Ala Arg His Leu Pro Lys Leu Gly Arg Ser Ile Ala Cys Pro
 1070 1075 1080
 Phe Val Glu Val Glu Ile Cys Gly Ala Glu Tyr Asp Asn Asn Lys
 1085 1090 1095
 Phe Lys Thr Thr Val Val Asn Asp Asn Gly Leu Ser Pro Ile Trp

 1100 1105 1110
 Ala Pro Thr Gln Glu Lys Val Thr Phe Glu Ile Tyr Asp Pro Asn
 1115 1120 1125
 Leu Ala Phe Leu Arg Phe Val Val Tyr Glu Glu Asp Met Phe Ser
 1130 1135 1140
 Asp Pro Asn Phe Leu Ala His Ala Thr Tyr Pro Ile Lys Ala Val
 1145 1150 1155
 Lys Ser Gly Phe Arg Ser Val Pro Leu Lys Asn Gly Tyr Ser Glu

 1160 1165 1170
 Asp Ile Glu Leu Ala Ser Leu Leu Val Phe Cys Glu Met Arg Pro
 1175 1180 1185

Val Leu Glu Ser Glu Glu Glu Leu Tyr Ser Ser Cys Arg Gln Leu
1190 1195 1200

Arg Arg Arg Gln Glu Glu Leu Asn Asn Gln Leu Phe Leu Tyr Asp
1205 1210 1215

Thr His Gln Asn Leu Arg Asn Ala Asn Arg Asp Ala Leu Val Lys
1220 1225 1230

Glu Phe Ser Val Asn Glu Asn Gln Leu Gln Leu Tyr Gln Glu Lys
1235 1240 1245

Cys Asn Lys Arg Leu Arg Glu Lys Arg Val Ser Asn Ser Lys Phe
1250 1255 1260

Tyr Ser
1265

<210> 19

<211> 1154

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Pro Gly Gly Gly Pro Glu Met Asp Asp Tyr Met Glu Thr Leu Lys
1 5 10 15

Asp Glu Glu Asp Ala Leu Trp Glu Asn Val Glu Cys Asn Arg His Met
20 25 30

Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Pro Ala Lys Leu Thr Pro Tyr Leu Arg Gln
35 40 45

Cys Lys Val Ile Asp Glu Gln Asp Glu Asp Glu Val Leu Asn Ala Pro
50 55 60

Met Leu Pro Ser Lys Ile Asn Arg Ala Gly Arg Leu Leu Asp Ile Leu
65 70 75 80

His Thr Lys Gly Gln Arg Gly Tyr Val Val Phe Leu Glu Ser Leu Glu
85 90 95

Phe Tyr Tyr Pro Glu Leu Tyr Lys Leu Val Thr Gly Lys Glu Pro Thr
100 105 110

Arg Arg Phe Ser Thr Ile Val Val Glu Glu Gly His Glu Gly Leu Thr

115	120	125	
His Phe Leu Met Asn Glu Val	Ile Lys Leu Gln Gln Gln Met	Lys Ala	
130	135	140	
Lys Asp Leu Gln Arg Cys Glu Leu Leu Ala Arg Leu Arg Gln Leu Glu			
145	150	155	160
Asp Glu Lys Lys Gln Met Thr Leu Thr Arg Val Glu Leu Leu Thr Phe			
	165	170	175
Gln Glu Arg Tyr Tyr Lys Met Lys Glu Glu Arg Asp Ser Tyr Asn Asp			
	180	185	190
Glu Leu Val Lys Val Lys Asp Asp Asn Tyr Asn Leu Ala Met Arg Tyr			
	195	200	205
Ala Gln Leu Ser Glu Glu Lys Asn Met Ala Val Met Arg Ser Arg Asp			
	210	215	220
Leu Gln Leu Glu Ile Asp Gln Leu Lys His Arg Leu Asn Lys Met Glu			
225	230	235	240
Glu Glu Cys Lys Leu Glu Arg Asn Gln Ser Leu Lys Leu Lys Asn Asp			
	245	250	255
Ile Glu Asn Arg Pro Lys Lys Glu Gln Val Leu Glu Leu Glu Arg Glu			
	260	265	270
Asn Glu Met Leu Lys Thr Lys Asn Gln Glu Leu Gln Ser Ile Ile Gln			
	275	280	285
Ala Gly Lys Arg Ser Leu Pro Asp Ser Asp Lys Ala Ile Leu Asp Ile			
	290	295	300
Leu Glu His Asp Arg Lys Glu Ala Leu Glu Asp Arg Gln Glu Leu Val			
305	310	315	320
Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Gln Glu Glu Ala Arg Gln Ala Glu Glu Leu			
	325	330	335
Arg Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Glu Asp Leu Glu Leu Lys Cys Ser			
	340	345	350
Thr Leu Gly Lys Asp Cys Glu Met Tyr Lys His Arg Met Asn Thr Val			
	355	360	365

Met Leu Gln Leu Glu Glu Val Glu Arg Glu Arg Asp Gln Ala Phe His
370 375 380

Ser Arg Asp Glu Ala Gln Thr Gln Tyr Ser Gln Cys Leu Ile Glu Lys
385 390 395 400

Asp Lys Tyr Arg Lys Gln Ile Arg Glu Leu Glu Glu Lys Asn Asp Glu
405 410 415

Met Arg Ile Glu Met Val Arg Arg Glu Ala Cys Ile Val Asn Leu Glu
420 425 430

Ser Lys Leu Arg Arg Leu Ser Lys Asp Ser Asn Asn Leu Asp Gln Ser
435 440 445

Leu Pro Arg Asn Leu Pro Val Thr Ile Ile Ser Gln Asp Phe Gly Asp
450 455 460

Ala Ser Pro Arg Thr Asn Gly Gln Glu Ala Asp Asp Ser Ser Thr Ser
465 470 475 480

Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Lys Tyr Phe Leu Pro Tyr His Pro Pro
485 490 495

Gln Arg Arg Met Asn Leu Lys Gly Ile Gln Leu Gln Arg Ala Lys Ser
500 505 510

Pro Ile Ser Leu Lys Arg Thr Ser Asp Phe Gln Ala Lys Gly His Glu
515 520 525

Glu Glu Gly Thr Asp Ala Ser Pro Ser Ser Cys Gly Ser Leu Pro Ile
530 535 540

Thr Asn Ser Phe Thr Lys Met Gln Pro Pro Arg Ser Arg Ser Ser Ile
545 550 555 560

Met Ser Ile Thr Ala Glu Pro Pro Gly Asn Asp Ser Ile Val Arg Arg
565 570 575

Tyr Lys Glu Asp Ala Pro His Arg Ser Thr Val Glu Glu Asp Asn Asp
580 585 590

Ser Gly Gly Phe Asp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Ser His Glu Arg
595 600 605

Tyr Ser Phe Gly Pro Ser Ser Ile His Ser Ser Ser Ser Ser His Gln

610	615	620	
Ser Glu Gly Leu Asp Ala Tyr Asp Leu Glu Gln Val Asn Leu Met Phe			
625	630	635	640
Arg Lys Phe Ser Leu Glu Arg Pro Phe Arg Pro Ser Val Thr Ser Val			
	645	650	655
Gly His Val Arg Gly Pro Gly Pro Ser Val Gln His Thr Thr Leu Asn			
	660	665	670
Gly Asp Ser Leu Thr Ser Gln Leu Thr Leu Leu Gly Gly Asn Ala Arg			
	675	680	685
Gly Ser Phe Val His Ser Val Lys Pro Gly Ser Leu Ala Glu Lys Ala			
	690	695	700
Gly Leu Arg Glu Gly His Gln Leu Leu Leu Leu Glu Gly Cys Ile Arg			
705	710	715	720
Gly Glu Arg Gln Ser Val Pro Leu Asp Thr Cys Thr Lys Glu Glu Ala			
	725	730	735
His Trp Thr Ile Gln Arg Cys Ser Gly Pro Val Thr Leu His Tyr Lys			
	740	745	750
Val Asn His Glu Gly Tyr Arg Lys Leu Val Lys Asp Met Glu Asp Gly			
	755	760	765
Leu Ile Thr Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Ile Arg Leu Asn Leu Asn Ile			
770	775	780	
Ser Ser Gln Leu Asp Ala Cys Thr Met Ser Leu Lys Cys Asp Asp Val			
785	790	795	800
Val His Val Arg Asp Thr Met Tyr Gln Asp Arg His Glu Trp Leu Cys			
	805	810	815
Ala Arg Val Asp Pro Phe Thr Asp His Asp Leu Asp Met Gly Thr Ile			
	820	825	830
Pro Ser Tyr Ser Arg Ala Gln Gln Leu Leu Leu Val Lys Leu Gln Arg			
	835	840	845
Leu Met His Arg Gly Ser Arg Glu Glu Val Asp Gly Thr His His Thr			
850	855	860	

Leu Arg Ala Leu Arg Asn Thr Leu Gln Pro Glu Glu Ala Leu Ser Thr
 865 870 875 880
 Ser Asp Pro Arg Val Ser Pro Arg Leu Ser Arg Ala Ser Phe Leu Phe
 885 890 895
 Gly Gln Leu Leu Gln Phe Val Ser Arg Ser Glu Asn Lys Tyr Lys Arg
 900 905 910

Met Asn Ser Asn Glu Arg Val Arg Ile Ile Ser Gly Ser Pro Leu Gly
 915 920 925
 Ser Leu Ala Arg Ser Ser Leu Asp Ala Thr Lys Leu Leu Thr Glu Lys
 930 935 940
 Gln Glu Glu Leu Asp Pro Glu Ser Glu Leu Gly Lys Asn Leu Ser Leu
 945 950 955 960
 Ile Pro Tyr Ser Leu Val Arg Ala Phe Tyr Cys Glu Arg Arg Arg Pro
 965 970 975

Val Leu Phe Thr Pro Thr Val Leu Ala Lys Thr Leu Val Gln Arg Leu
 980 985 990
 Leu Asn Ser Gly Gly Ala Met Glu Phe Thr Ile Cys Lys Ser Asp Ile
 995 1000 1005
 Val Thr Arg Asp Glu Phe Leu Arg Arg Gln Lys Thr Glu Thr Ile
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Pro Asn Ala Phe Glu Cys Ile Ala
 1025 1030 1035

Pro Ala Asn Ile Glu Ala Val Ala Ala Lys Asn Lys His Cys Leu
 1040 1045 1050
 Leu Glu Ala Gly Ile Gly Cys Thr Arg Asp Leu Ile Lys Ser Asn
 1055 1060 1065
 Ile Tyr Pro Ile Val Leu Phe Ile Arg Val Cys Glu Lys Asn Ile
 1070 1075 1080
 Lys Arg Phe Arg Lys Leu Leu Pro Arg Pro Glu Thr Glu Glu Glu
 1085 1090 1095

Phe Leu Arg Val Cys Arg Leu Lys Glu Lys Glu Leu Glu Ala Leu

1100 1105 1110
 Pro Cys Leu Tyr Ala Thr Val Glu Pro Asp Met Trp Gly Ser Val
 1115 1120 1125
 Glu Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Asp Lys Ile Gly Glu Glu Gln
 1130 1135 1140
 Arg Lys Thr Ile Trp Val Asp Glu Asp Gln Leu
 1145 1150
 <210> 20
 <211> 1155

 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 Met Pro Gly Gly Gly Pro Glu Met Asp Asp Tyr Met Glu Thr Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Asp Ala Leu Trp Glu Asn Val Glu Cys Asn Arg His Met
 20 25 30
 Leu Ser Arg Tyr Ile Asn Pro Ala Lys Leu Thr Pro Tyr Leu Arg Gln
 35 40 45
 Cys Lys Val Ile Asp Glu Gln Asp Glu Asp Glu Val Leu Asn Ala Pro
 50 55 60

 Met Leu Pro Ser Lys Ile Asn Arg Ala Gly Arg Leu Leu Asp Ile Leu
 65 70 75 80
 His Thr Lys Gly Gln Arg Gly Tyr Val Val Phe Leu Glu Ser Leu Glu
 85 90 95
 Phe Tyr Tyr Pro Glu Leu Tyr Lys Leu Val Thr Gly Lys Glu Pro Thr
 100 105 110
 Arg Arg Phe Ser Thr Ile Val Val Glu Glu Gly His Glu Gly Leu Thr
 115 120 125

 His Phe Leu Met Asn Glu Val Ile Lys Leu Gln Gln Gln Met Lys Ala
 130 135 140
 Lys Asp Leu Gln Arg Cys Glu Leu Leu Ala Arg Leu Arg Gln Leu Glu
 145 150 155 160

Asp Glu Lys Lys Gln Met Thr Leu Thr Arg Val Glu Leu Leu Thr Phe
 165 170 175
 Gln Glu Arg Tyr Tyr Lys Met Lys Glu Glu Arg Asp Ser Tyr Asn Asp
 180 185 190

 Glu Leu Val Lys Val Lys Asp Asp Asn Tyr Asn Leu Ala Met Arg Tyr
 195 200 205
 Ala Gln Leu Ser Glu Glu Lys Asn Met Ala Val Met Arg Ser Arg Asp
 210 215 220
 Leu Gln Leu Glu Ile Asp Gln Leu Leu Lys His Arg Leu Asn Lys Met
 225 230 235 240
 Glu Glu Glu Cys Lys Leu Glu Arg Asn Gln Ser Leu Lys Leu Lys Asn
 245 250 255

 Asp Ile Glu Asn Arg Pro Lys Lys Glu Gln Val Leu Glu Leu Glu Arg
 260 265 270
 Glu Asn Glu Met Leu Lys Thr Lys Asn Gln Glu Leu Gln Ser Ile Ile
 275 280 285
 Gln Ala Gly Lys Arg Ser Leu Pro Asp Ser Asp Lys Ala Ile Leu Asp
 290 295 300
 Ile Leu Glu His Asp Arg Lys Glu Ala Leu Glu Asp Arg Gln Glu Leu
 305 310 315 320

 Val Asn Arg Ile Tyr Asn Leu Gln Glu Glu Ala Arg Gln Ala Glu Glu
 325 330 335
 Leu Arg Asp Lys Tyr Leu Glu Glu Lys Glu Asp Leu Glu Leu Lys Cys
 340 345 350
 Ser Thr Leu Gly Lys Asp Cys Glu Met Tyr Lys His Arg Met Asn Thr
 355 360 365
 Val Met Leu Gln Leu Glu Glu Val Glu Arg Glu Arg Asp Gln Ala Phe
 370 375 380

 His Ser Arg Asp Glu Ala Gln Thr Gln Tyr Ser Gln Cys Leu Ile Glu
 385 390 395 400
 Lys Asp Lys Tyr Arg Lys Gln Ile Arg Glu Leu Glu Glu Lys Asn Asp

405 410 415
 Glu Met Arg Ile Glu Met Val Arg Arg Glu Ala Cys Ile Val Asn Leu
 420 425 430
 Glu Ser Lys Leu Arg Arg Leu Ser Lys Asp Ser Asn Asn Leu Asp Gln
 435 440 445

 Ser Leu Pro Arg Asn Leu Pro Val Thr Ile Ile Ser Gln Asp Phe Gly
 450 455 460
 Asp Ala Ser Pro Arg Thr Asn Gly Gln Glu Ala Asp Asp Ser Ser Thr
 465 470 475 480
 Ser Glu Glu Ser Pro Glu Asp Ser Lys Tyr Phe Leu Pro Tyr His Pro
 485 490 495
 Pro Gln Arg Arg Met Asn Leu Lys Gly Ile Gln Leu Gln Arg Ala Lys
 500 505 510

 Ser Pro Ile Ser Leu Lys Arg Thr Ser Asp Phe Gln Ala Lys Gly His
 515 520 525
 Glu Glu Glu Gly Thr Asp Ala Ser Pro Ser Ser Cys Gly Ser Leu Pro
 530 535 540
 Ile Thr Asn Ser Phe Thr Lys Met Gln Pro Pro Arg Ser Arg Ser Ser
 545 550 555 560
 Ile Met Ser Ile Thr Ala Glu Pro Pro Gly Asn Asp Ser Ile Val Arg
 565 570 575

 Arg Tyr Lys Glu Asp Ala Pro His Arg Ser Thr Val Glu Glu Asp Asn
 580 585 590
 Asp Ser Gly Gly Phe Asp Ala Leu Asp Leu Asp Asp Asp Ser His Glu
 595 600 605
 Arg Tyr Ser Phe Gly Pro Ser Ser Ile His Ser Ser Ser Ser Ser His
 610 615 620
 Gln Ser Glu Gly Leu Asp Ala Tyr Asp Leu Glu Gln Val Asn Leu Met
 625 630 635 640

 Phe Arg Lys Phe Ser Leu Glu Arg Pro Phe Arg Pro Ser Val Thr Ser
 645 650 655

Val Gly His Val Arg Gly Pro Gly Pro Ser Val Gln His Thr Thr Leu
660 665 670

Asn Gly Asp Ser Leu Thr Ser Gln Leu Thr Leu Leu Gly Gly Asn Ala
675 680 685

Arg Gly Ser Phe Val His Ser Val Lys Pro Gly Ser Leu Ala Glu Lys
690 695 700

Ala Gly Leu Arg Glu Gly His Gln Leu Leu Leu Leu Glu Gly Cys Ile
705 710 715 720

Arg Gly Glu Arg Gln Ser Val Pro Leu Asp Thr Cys Thr Lys Glu Glu
725 730 735

Ala His Trp Thr Ile Gln Arg Cys Ser Gly Pro Val Thr Leu His Tyr
740 745 750

Lys Val Asn His Glu Gly Tyr Arg Lys Leu Val Lys Asp Met Glu Asp
755 760 765

Gly Leu Ile Thr Ser Gly Asp Ser Phe Tyr Ile Arg Leu Asn Leu Asn
770 775 780

Ile Ser Ser Gln Leu Asp Ala Cys Thr Met Ser Leu Lys Cys Asp Asp
785 790 795 800

Val Val His Val Arg Asp Thr Met Tyr Gln Asp Arg His Glu Trp Leu
805 810 815

Cys Ala Arg Val Asp Pro Phe Thr Asp His Asp Leu Asp Met Gly Thr
820 825 830

Ile Pro Ser Tyr Ser Arg Ala Gln Gln Leu Leu Leu Val Lys Leu Gln
835 840 845

Arg Leu Met His Arg Gly Ser Arg Glu Glu Val Asp Gly Thr His His
850 855 860

Thr Leu Arg Ala Leu Arg Asn Thr Leu Gln Pro Glu Glu Ala Leu Ser
865 870 875 880

Thr Ser Asp Pro Arg Val Ser Pro Arg Leu Ser Arg Ala Ser Phe Leu
885 890 895

Phe Gly Gln Leu Leu Gln Phe Val Ser Arg Ser Glu Asn Lys Tyr Lys

900	905	910	
Arg Met Asn Ser Asn Glu Arg Val Arg Ile Ile Ser Gly Ser Pro Leu			
915	920	925	
Gly Ser Leu Ala Arg Ser Ser Leu Asp Ala Thr Lys Leu Leu Thr Glu			
930	935	940	
Lys Gln Glu Glu Leu Asp Pro Glu Ser Glu Leu Gly Lys Asn Leu Ser			
945	950	955	960
Leu Ile Pro Tyr Ser Leu Val Arg Ala Phe Tyr Cys Glu Arg Arg Arg			
965	970	975	
Pro Val Leu Phe Thr Pro Thr Val Leu Ala Lys Thr Leu Val Gln Arg			
980	985	990	
Leu Leu Asn Ser Gly Gly Ala Met Glu Phe Thr Ile Cys Lys Ser Asp			
995	1000	1005	
Ile Val Thr Arg Asp Glu Phe Leu Arg Arg Gln Lys Thr Glu Thr			
1010	1015	1020	
Ile Ile Tyr Ser Arg Glu Lys Asn Pro Asn Ala Phe Glu Cys Ile			
1025	1030	1035	
Ala Pro Ala Asn Ile Glu Ala Val Ala Ala Lys Asn Lys His Cys			
1040	1045	1050	
Leu Leu Glu Ala Gly Ile Gly Cys Thr Arg Asp Leu Ile Lys Ser			
1055	1060	1065	
Asn Ile Tyr Pro Ile Val Leu Phe Ile Arg Val Cys Glu Lys Asn			
1070	1075	1080	
Ile Lys Arg Phe Arg Lys Leu Leu Pro Arg Pro Glu Thr Glu Glu			
1085	1090	1095	
Glu Phe Leu Arg Val Cys Arg Leu Lys Glu Lys Glu Leu Glu Ala			
1100	1105	1110	
Leu Pro Cys Leu Tyr Ala Thr Val Glu Pro Asp Met Trp Gly Ser			
1115	1120	1125	
Val Glu Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Asp Lys Ile Gly Glu Glu			
1130	1135	1140	

Gln Arg Lys Thr Ile Trp Val Asp Glu Asp Gln Leu

1145	1150	1155	
<210>	21		
<211>	1977		
<212>	DNA		
<213>	Homo sapiens		
<400>	21		
atggccgcag	tgtattctgga	gagcatcttt	ctgaagcgat cccaacagaa aaagaaaaca 60
tcacctctaa	acttcaagaa	ggcctgttt	ctcttgaccg tgcacaaact ctctactat 120
gagtatgact	ttgaacgtgg	gagaagaggc	agtaagaagg gttcaataga tgttgagaag 180
atcacttggt	ttgaacaggt	ggttcctgaa	aaaaatctc ctccagaaag acagattccg 240
agaagagggt	aagagtcag	tgaaatggag	caaatttcaa tcattgaaag gttcccttat 300
cccttccagg	ttgtatatga	tgaagggcct	ctctacgtct tctcccaac tgaagaacta 360
aggaagcggg	ggattcacca	gctcaaaaac	gtaatccggg acaacagtga tctgggtcag 420
aaatatcacc	cttgcttctg	gatcgatggg	cagtatctct gctgctctca gacagccaaa 480
aatgctatgg	gctgccaagt	tttgagagac	aggaatggaa gcttaaaacc tgggagttct 540
caccggaaga	caaaaaagcc	tcttccccca	acgctgagg aggaccagat cttgaaaaag 600
ccactaccgc	ctgagccagc	agcagcacca	gtctccacaa gtgagctgaa aaagggtgtg 660
gccctttatg	attacatgcc	aatgaatgca	aatgatctac agctgcggaa gggtgatgaa 720
tattttatct	tggaggaaag	caacttacca	tgggtggagag cacgagataa aaatgggcag 780
gaaggctaca	ttcctagtaa	ctatgtcact	gaagcagaag actccataga aatgtatgag 840
tggatttcca	aacacatgac	tcggagtcag	gctgagcaac tgctaaagca agaggggaaa 900
gaaggaggtt	tcattgtcag	agactccagc	aaagctggca aatatacagt gtctgtgttt 960
gctaaatcca	caggggaccc	tcaaggggtg	atacgtcatt atgttgtgtg ttccacacct 1020
cagagccagt	attacctggc	tgagaagcac	cttttcagca ccataccctga gctcattaac 1080
taccatcagc	acaactctgc	aggactcata	tccaggctca aatatccagt gtctcaacaa 1140
aacaagaatg	caccttcac	tgcaggcctg	ggatacggat catgggaaat tgatccaaag 1200
gacctgacct	tcttgaagga	gctggggact	ggacaatttg gggtagtgaa gtatgggaaa 1260
tggagaggcc	agtacgacgt	ggccatcaag	atgatcaaag aaggctccat gtctgaagat 1320
gaattcattg	aagaagccaa	agtcattgat	aatctttccc atgagaagct ggtgcagttg 1380
tatggcgtct	gcaccaagca	gcgccccatc	ttcatcatca ctgagtacat ggccaatggc 1440
tgccctctga	actacctgag	ggagatgcgc	caccgcttcc agactcagca gctgctagag 1500

atgtgcaagg atgtctgtga agccatggaa tacctggagt caaagcagtt ccttcaccga 1560

gacctggcag ctcgaaactg tttggtaaac gatcaaggag ttgttaaagt atctgatttc 1620

ggcctgtcca ggtatgtcct ggatgatgaa tacacaagct cagtaggctc caaatttcca 1680

gtccggtggg cccaccgga agtcctgatg tatagcaagt tcagcagcaa atctgacatt 1740

tgggcttttg gggttttgat gtgggaaatt tactccctgg ggaagatgcc atatgagaga 1800

tttactaaca gtgagactgc tgaacacatt gcccaaggcc tacgtctcta caggcctcat 1860

ctggcttcag agaaggtata taccatcatg tacagttgct ggcatgagaa agcagatgag 1920

cgtcccactt tcaaaattct tctgagcaat attctagatg tcatggatga agaatcc 1977

<210> 22

<211> 1977

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

atggccgcag tgattctgga gagcatcttt ctgaagcgat cccaacagaa aaagaaaaca 60

tcacctctaa acttcaagaa ggcctgttt ctcttgaccg tgcacaaact ctctactat 120

gagtatgact ttgaacgtgg gagaagaggc agtaagaagg gttcaataga tgttgagaag 180

atcactttgtg ttgaacaggt gggttcctgaa aaaaatcctc ctccagaaag acagattccg 240

agaagagggtg aagagtcag tgaatggag caaatttcaa tcattgaaag gttcccttat 300

cccttcagg ttgtatatga tgaagggcct ctctacgtct tctcccaac tgaagaacta 360

aggaagcggg ggattcacca gctcaaaaac gtaatccggg acaacagtga tctggttcag 420

aaatatcacc cttgcttctg gatcgatggg cagtatctct gctgctctca gacagccaaa 480

aatgctatgg gctgccaaat tttggagaac aggaatggaa gcttaaaacc tgggagttct 540

caccggaaga caaaaaagcc tcttccccca acgcctgagg aggaccagat cttgaaaaag 600

ccactaccgc ctgagccagc agcagcacca gtctccaca gtgagctgaa aaaggttgtg 660

gccctttatg attacatgcc aatgaatgca aatgatctac agctgcgga gggatgatgaa 720

tattttatct tggaggaaag caacttacca tgggtggagag cacgagataa aaatgggcag 780

gaaggctaca ttctagtaa ctatgtcact gaagcagaag actccataga aatgtatgag 840

tggatttcca aacacatgac tcggagtcag gctgagcaac tgctaaagca agaggggaaa 900

gaaggagggtt tcattgtcag agactccagc aaagctggca aatatacagt gtctgtgttt 960

gctaaatcca caggggaccc tcaaggggtg atacgtcatt atgttgtgtg ttccacacct 1020

cagagccagt attacctggc tgagaagcac cttttcagca ccatccctga gctcattaac 1080

taccatcagc acaactctgc aggactcata tccaggctca aatatccagt gtctcaacaa	1140
aacaagaatg caccttccac tgcaggcctg ggatacggat catgggaaat tgatccaaag	1200
gacctgacct tcttgaagga gctggggact ggacaatttg gggtagtga gtatgggaaa	1260
tggagaggcc agtacgacgt ggccatcaag atgatcaaag aaggctccat gtctgaagat	1320
gaattcattg aagaagccaa agtcatgatg aatctttccc atgagaagct ggtgcagtgtg	1380
tatggcgtct gcaccaagca gcgccccatc ttcacatca ctgagtacat ggccaatggc	1440
agcctcctga actacctgag ggagatgcgc caccgcttcc agactcagca gctgctagag	1500
atgtgcaagg atgtctgtga agccatggaa tacctggagt caaagcagtt ccttcaccga	1560
gacctggcag ctcgaaactg tttggtaaac gatcaaggag ttgttaaagt atctgatttc	1620
ggcctgtcca ggtatgtcct ggatgatgaa tacacaagct cagtaggctc caaatttcca	1680
gtccgggtgt cccaccgga agtcctgatg tatagcaagt tcagcagcaa atctgacatt	1740
tgggcttttg gggttttgat gtgggaaatt tactccctgg ggaagatgcc atatgagaga	1800
tttactaaca gtgagactgc tgaacacatt gccaaggcc tacgtctcta caggcctcat	1860
ctggcttcag agaaggtata taccatcatg tacagtgtt ggcatgagaa agcagatgag	1920
cgtcccactt tcaaaattct tctgagcaat attctagatg tcatggatga agaatcc	1977
<210> 23	
<211> 1977	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 23	
atggccgcag tgattctgga gagcatcttt ctgaagcgat cccaacagaa aaagaaaaca	60
tcacctctaa acttcaagaa gcgcctgttt ctcttgaccg tgcacaaact ctctactat	120
gagtatgact ttgaacgtgg gagaagaggc agtaagaagg gttcaataga tgttgagaag	180
atcacttgtg ttgaacaggt ggttcctgaa aaaaatcctc ctccagaaag acagattccg	240
agaagagggtg aagagtcag tgaatggag caaatttcaa tcattgaaag gttcccttat	300
cccttcagg ttgtatatga tgaaggcct ctctacgtct tctccccaac tgaagaacta	360
aggaagcggg ggattcacca gctcaaaaac gtaatccggg acaacagtga tctggttcag	420
aaatatcacc cttgcttctg gatcgatggg cagtatctct gctgctctca gacagccaaa	480
aatgctatgg gctgccaaat tttggagaac aggaatggaa gcttaaaacc tgggagtctt	540
caccggaaga caaaaaagcc tcttccccca acgcctgagg aggaccagat cttgaaaaag	600
ccactaccgc ctgagccagc agcagcacca gtctccacaa gtgagctgaa aaaggttgtg	660

gccctttatg attacatgcc aatgaatgca aatgatctac agctgcggaa gggatgatgaa	720
tattttatct tggaggaaag caacttacca tggaggagag cacgagataa aaatgggcag	780
gaaggctaca ttccatgtaa ctatgtcact gaagcagaag actccataga aatgtatgag	840
tggtattcca aacacatgac tcggagtcag gctgagcaac tgctaaagca agaggggaaa	900
gaaggagggt tcatgtgcag agactccagc aaagctggca aatatacagt gtctgtgttt	960
gctaaatcca caggggaccc tcaaggggtg atacgtcatt atgttgtgtg ttccacacct	1020
cagagccagt attacctggc tgagaagcac cttttcagca ccatccctga gctcattaac	1080
taccatcagc acaactctgc aggactcata tccaggctca aatatccagt gtctcaacaa	1140
aacaagaatg caccttccac tgcaggcctg ggatacggat catgggaaat tgatccaaag	1200
gacctgacct tcttgaagga gctggggact ggacaatttg gggtagttaa gtatgggaaa	1260
tgagaggccc agtacgacgt ggccatcaag atgatcaaag aaggctccat gtctgaagat	1320
gaattcattg aagaagccaa agtcatgatg aatctttccc atgagaagct ggtgcagttg	1380
tatggcgtct gcaccaagca gcgccccatc ttcatcatca ctgagtacat ggccaatggc	1440
tcctctctga actacctgag ggagatgcgc caccgcttcc agactcagca gctgctagag	1500
atgtgcaagg atgtctgtga agccatggaa tacctggagt caaagcagtt ccttcaccga	1560
gacctggcag ctcgaaactg tttggtaaac gatcaaggag ttgttaaagt atctgatttc	1620
ggcctgtcca ggtatgtcct ggatgatgaa tacacaagct cagtaggctc caaatttcca	1680
gtccgggtgt cccaccgga agtcctgatg tatagcaagt tcagcagcaa atctgacatt	1740
tgggcttttg gggttttgat gtgggaaatt tactccctgg ggaagatgcc atatgagaga	1800
tttactaaca gtgagactgc tgaacacatt gccaaggcc tacgtctcta caggcctcat	1860
ctggcttcag agaaggatata taccatcatg tacagttgct ggcatgagaa agcagatgag	1920
cgteccactt tcaaaattct tctgagcaat attctagatg tcatggatga agaatcc	1977
<210> 24	
<211> 3462	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 24	
atgccaggag gaggccaga gatggatgac tacatggaga cgctgaagga tgaagaggac	60
gccttgtggg agaatgtgga gtgtaaccgg cacatgctca gccgctatat caaccctgcc	120
aagctcacgc cctacctgcg tcagtgtgag gtcattgatg agcaggatga agatgaagtg	180
cttaatgccc ctatgctgcc atccaagatc aaccgagcag gccggctgtt ggacattcta	240

cataccaagg ggcaaagggg ctatgtggtc ttcttggaga gcctagaatt ttattacca	300
gaactgtaca aactggtgac tgggaaagag cccactcgga gattctccac cattgtggtg	360
gaggaaggcc acgagggcct cacgcacttc ctgatgaacg aggtcatcaa gctgcagcag	420
cagatgaagg ccaaggacct gcaacgctgc gagctgctgg ccaggttgcg gcagctggag	480
gatgagaaga agcagatgac gctgacgcgc gtggagctgc taaccttcca ggagcggtag	540
tacaagatga aggaagagcg ggacagctac aatgacgagc tggtaaggt gaaggacgac	600
aactacaact tagccatgcg ctacgcacag ctgagtgagg agaagaacat ggcggtag	660
aggagccgag acctccaact cgagatcgat cagctaaagc accggttgaa taagatggag	720
gaggaatgta agctggagag aaatcagttc ctaaaactga agaagacat tgaatcg	780
ccaagaagg agcaggttct ggaactggag cgggagaatg aaatgctgaa gacaaaaac	840
caggagctgc agtccatcat ccaggccggg aagcgagcc tgccagactc agacaaggcc	900
atcctggaca tcttggaaaca cgaccgaag gagccctgg aggacaggca ggagctggtc	960
aacaggatct acaacctgca ggaggaggcc cgccaggcag aggagctgcg agacaagtac	1020
ctggaggaga aggaggacct ggagctcaag tgctcgaccc tgggaaagga ctgtgaaatg	1080
tacaagcacc gcatgaacac ggtcatgtg cagctggagg aggtggagcg ggagcgggac	1140
caggccttcc actcccgaga tgaagctcag acacagtact cgcagtgtt aatcgaaaag	1200
gacaagtaca ggaagcagat ccgcgagctg gaggagaaga acgacgagat gaggatcgag	1260
atggtgcggc gggaggcctg catcgtcaac ctggagagca agtgcggcg cctctccaag	1320
gacagcaaca acctggacca gactctgccc aggaacctgc cagtaacct catctctcag	1380
gactttgggg atgccagccc caggaccaat ggtcaagaag ctgacgattc ttccacctcg	1440
gaggagtac ctgaagacag caagtacttc ctgccctacc atccgcccc ggcaggatg	1500
aacctgaagg gcatccagct gcagagagcc aaatccccc tcagcctgaa gcgaacatca	1560
gattttcaag ccaaggggca cgaggaagaa ggcacggacg ccagccctag ctctgcgga	1620
tctctgccc tcaccaactc cttaccaag atgcagcccc cccggagccg cagcagcatc	1680
atgtcaatca ccgccgagcc cccgggaaac gactccatcg tcagacgcta caaggaggac	1740
gcgccccatc gcagcacagt cgaagaagac aatgacagcg gcgggtttga cgccttagat	1800
ctggatgatg acagtacga acgtactcc ttgggacct cctccatcca ctctctctc	1860
tcctccacc aatccgaggg cctggatgcc tacgacctgg agcaggtcaa cctcatgttc	1920
aggaagtct ctctggaaag acccttcgg ccttcggta cctctgtggg gcacgtgcgg	1980
ggcccagggc cctcgggtca gcacacgacg ctgaatggcg acagcctcac ctcccagtc	2040
accctgctgg ggggcaacgc gcgaggagc ttctgtcact cggtaagcc tggtctctg	2100

gccgagaaag ccggcctccg tgagggccac cagctgctgc tgctagaagg ctgcatccga	2160
ggcgagaggc agagtgtccc gttggacaca tgcaccaaag aggaagccca ctggaccatc	2220
cagaggtgca gcggccccgt cacgtgcac tacaaggcca accacgaagg gtaccggaag	2280
ctggtgaagg acatggagga cggcctgac acatcggggg actcgttcta catccggctg	2340
aacctgaaca tctccagcca gctggacgcc tgcacatgt ccctgaagtg tgacgatgtt	2400
gtgcacgtcc gtgacacat gtaccaggac aggcacagat ggctgtgcgc gcgggtcgac	2460
cctttcacag accatgacct ggatatgggc accataacca gctacagccg agcccagcag	2520
ctcctcctgg tgaactgca gcgcctgatg caccgaggca gccgggagga ggtagacggc	2580
acccaccaca ccctgcgggc actccggaac accctgcagc cagaagaagc gctttcaaca	2640
agcgaccccc gggtcagccc cgtctctcg cgagcaagct tcctttttgg ccagctcctt	2700
cagttcgta gcaggtccga gaacaagtat aagcggatga acagcaacga gcgggtccgc	2760
atcatctcgg ggagtccgt agggagcctg gcccggtcct cgctggacgc caccaagctc	2820
ttgactgaga agcaggaaga gctggaccct gagagcgagc tgggcaagaa cctcagctc	2880
atccctaca gcctggtacg cgccttctac tgcgagcgcc gccggcccgt gctcttcaca	2940
cccaccgtgc tggccaagac gctggtgcag aggtctgctc actcgggagg tgccatggag	3000
ttcaccatct gcaagtcaga tatcgtcaca agagatgagt tcctcagaag gcagaagacg	3060
gagaccatca tctactcccg agagaagaac cccaacgcgt tcgaatgcat cggccctgcc	3120
aacattgaag ctgtggccgc caagaacaag cactgcctgc tggaggctgg gatcggtgc	3180
acaagagact tgatcaagtc caacatctac cccatcgtgc tcttcattccg ggtgtgtgag	3240
aagaacatca agaggttcag aaagctgctg ccccgacctg agacggagga ggagttcctg	3300
cgctgtgcc ggctgaagga gaaggagctg gaggccctgc cgtgcctgta cgccacggtg	3360
gaacctgaca tgtggggcag cgtagaggag ctgctccgcg ttgtcaagga caagatcggc	3420
gaggagcagc gcaagacat ctgggtggac gaggaccagc tg	3462
<210> 25	
<211> 3465	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 25	
atgccaggag gagggccaga gatggatgac tacatggaga cgctgaagga tgaagaggac	60
gccttgtggg agaattgtga gtgtaacgg cacatgctca gccgtatat caaccctgcc	120
aagctcacgc cctacctgcg tcagtgtgaa gtcatgtatg agcaggatga agatgaagtg	180

cttaatgccc ctatgctgcc atccaagatc aaccgagcag gccggctgtt ggacattcta	240
cataccaagg ggcaaagggg ctatgtggtc ttcttggaga gcctagaatt ttattacca	300
gaactgtaca aactggtgac tgggaaagag cccactcgga gattctccac cattgtggtg	360
gaggaaggcc acgagggcct cacgcacttc ctgatgaacg aggtcatcaa gctgcagcag	420
cagatgaagg ccaaggacct gcaacgctgc gagctgctgg ccaggttgcg gcagctggag	480
gatgagaaga agcagatgac gctgacgcgc gtggagctgc taaccttcca ggagcggtag	540
tacaagatga aggaagagcg ggacagctac aatgacgagc tggtaaggt gaaggacgac	600
aactacaact tagccatgcg ctacgcacag ctgagtggg agaagaacat ggcggtag	660
aggagccgag acctccaact cgagatcgat cagcttttaa agcaccggtt gaataagatg	720
gaggaggaat gtaagctgga gagaatcag tctctaaaac tgaagaatga cattgaaaat	780
cggccaaga aggagcaggt tctggaactg gagcgggaga atgaaatgct gaagaccaa	840
aaccaggagc tgcagtccat catccaggcc gggaagcgca gcctgccaga ctgagacaag	900
gccatcctgg acatcttga acacgaccgc aaggaggccc tggaggacag gcaggagctg	960
gtcaacagga tctacaacct gcaggaggag gcccgccagg cagaggagct gcgagacaag	1020
tacctggagg agaaggagga cctggagctc aagtgtcga ccctgggaaa ggactgtgaa	1080
atgtacaagc accgcatgaa cacggtcatg ctgcagctgg aggaggtgga gcgggagcgg	1140
gaccaggcct tccactccc agatgaagct cagacacagt actcgagtg cttaatcgaa	1200
aaggacaagt acaggaagca gatccgcgag ctggaggaga agaacgacga gatgaggatc	1260
gagatggtgc ggcgggaggc ctgcatcgtc aacctggaga gcaagctgcg gcgcctctcc	1320
aaggacagca acaacctgga ccagagtctg cccaggaacc tgccagtaac catcatctct	1380
caggactttg gggatgccag ccccaggacc aatggtcaag aagctgacga ttcttcacc	1440
tcggaggagt cacctgaaga cagcaagtac ttctgcct accatccgcc ccagcgagg	1500
atgaacctga agggcatcca gctgcagaga gccaatccc ccatcagcct gaagcgaaca	1560
tcagattttc aagccaaggg gcacaggaa gaaggcacgg acgccagccc tagctcctgc	1620
ggatctctgc ccatcacaa ctcttcacc aagatgcagc ccccccggag ccgcagcagc	1680
atcatgtcaa tcaccgccga gccccggga aacgactcca tcgtcagacg ctacaaggag	1740
gacgcgcccc atcgagcac agtcgaagaa gacaatgaca gcggcgggtt tgacgcctta	1800
gatctggaig atgacagtca cgaacgtac tccttcggac cctctccat ccaactctcc	1860
tcctctccc accaatccga gggcctggat gcctacgacc tggagcaggt caacctcatg	1920

ttcaggaagt tctctctgga aagacccttc cggccttcgg tcacctctgt ggggcacgtg 1980

cggggcccag ggccctcggg gcagcacacg acgtggaatg gcgacagcct cacctcccag 2040

ctcacctgc tggggggcaa cgcgcgaggg agcttcgtgc actcgggtcaa gcctggctct 2100

ctggccgaga aagccggcct ccgtgagggc caccagctgc tgcctgctaga aggctgcatc 2160

cgaggcgaga ggagagtggt cccgttggac acatgcacca aagaggaagc ccactggacc 2220

atccagaggt gcagcggccc cgtcacgtgc cactacaagg tcaaccacga agggtagcgg 2280

aagctggtga aggacatgga ggacggcctg atcacatcgg gggactcgtt ctacatccgg 2340

ctgaacctga acatctccag ccagctggac gcctgcacca tgtccctgaa gtgtgacgat 2400

gttgtgcacg tccgtgacac catgtaccag gacaggcacg agtggctgtg cgcgcgggtc 2460

gaccttttca cagacatga cctggatatg ggcaccatac ccagctacag ccgagcccag 2520

cagctcctcc tggtgaaact gcagcgcctg atgcaccgag gcagccggga ggaggtagac 2580

ggcaccacc acaccctgcg ggactcctcg aacaccctgc agccagaaga agcgttttca 2640

acaagcgacc cccgggtcag ccccgctc tcgcgagcaa gcttcctttt tggccagctc 2700

cttcagtctg tcagcaggtc cgagaacaag tataagcgga tgaacagcaa cgagcgggtc 2760

cgcacatct cggggagtcc gctagggagc ctggcccggg cctcgctgga cgccaccaag 2820

ctcttgactg agaagcagga agagctggac cctgagagcg agctgggcaa gaacctcagc 2880

ctcatccct acagcctggg acgcgccttc tactgcgagc gccgccggcc cgtgctcttc 2940

acaccaccg tgcgtggcaa gacgtggtg cagaggctgc tcaactcggg aggtgccatg 3000

gagttacca tctgcaagtc agatatcgtc acaagagatg agttcctcag aagcgagaag 3060

acggagacca tcactactc ccgagagaag aaccccaacg cgttcgaatg catcgccctt 3120

gccaacattg aagctgtggc cgccaagaac aagcactgcc tgctggaggc tgggatcggc 3180

tgcacaagag acttgatcaa gtccaacatc taccccatcg tgctcttcat ccgggtgtgt 3240

gagaagaaca tcaagaggtt cagaaagctg ctgccccgac ctgagacgga ggaggagttc 3300

ctgcgcgtgt gccggctgaa ggagaaggag ctggaggccc tgccgtgcct gtacgccacg 3360

gtggaacctg acatgtgggg cagcgtagag gagctgctcc gcgttgtcaa ggacaagatc 3420

ggcgaggagc agcgcaagac catctgggtg gacgaggacc agctg 3465

<210> 26

<211> 3795

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgtccacca cggtaaatgt agattccctt gcggaatatg agaagagcca gatcaagaga	60
gccctggagc tggggacggt gatgactgtg ttcagcttcc gcaagtccac ccccgagcgg	120
agaaccgtcc aggtgatcat ggagacgcgg caggtggcct ggagcaagac cgccgacaag	180
atcgagggct tcttggatat catggaaata aaagaaatcc gcccaggga gaactccaaa	240
gatttcgagc gagcaaaagc agttcgccag aaagaagact gctgcttcac catcctatat	300
ggcactcagt tcttcctcag cacgctcagc ttggcagctg actctaaaga ggatgcagtt	360
aactggctct ctggcttgaa aatcttacac caggaagcga tgaatgcgtc cacgccacc	420
attatcgaga gttggctgag aaagcagata tattctgtgg atcaaaccag aagaaacagc	480
atcagtctcc gagagttgaa gaccatcttg cccctgatca actttaaggt gagcagtgcc	540
aagttcctta aagataagtt tgtggaaata ggagcacaca aagatgagct cagctttgaa	600
cagttccatc tcttctataa aaaacttatg tttgaacagc aaaaatcgat tctcgatgaa	660
ttcaaaaagg attcgccgt gttcatcctg gggaaactg acaggccgga tgcctctgct	720
gtttacctgc atgacttcca gaggtttctc atacatgaac agcaggagca ttgggctcag	780
gatctgaaca aagtccgtga gcgcatgaca aagttcattg atgacacat gcgtgaaact	840
gctgagcctt tcttgtttgt ggatgagttc ctcacgtacc tgttttcacg agaaaacagc	900
atctgggatg agaagtatga cgcggtggac atgcaggaca tgaacaaccc cctgtctcat	960
tactggatct cctcgtcaca taacacgtac cttacaggtg accagctgcg gagcgagtcg	1020
tccccagaag cttacatccg ctgcctgcgc atgggctgtc gctgcattga actggactgc	1080
tgggacgggc ccgatgggaa gccggtcatc taccatggct ggacgcggac taccaagatc	1140
aagtttgacg acgtcgtgca ggccatcaaa gaccacgctt ttgttacctc gagcttccca	1200
gtgatcctgt ccatcgagga gcactgcagc gtggagcaac agcgtcacat ggccaaggcc	1260
ttcaaggaag tatttggcga cctgctgttg acgaagccca cggaggccag tgctgaccag	1320
ctgcctcgc ccagccagct gcgggagaag atcatcatca agcataagaa gctgggcccc	1380
cgaggcgatg tggatgtcaa catggaggac aagaaggacg aacacaagca acagggggag	1440
ctgtacatgt gggattccat tgaccagaaa tggactcggc actactgcgc cattgccgat	1500
gccaagctgt ccttcagtga tgacattgaa cagactatgg aggaggaagt gccccaggat	1560
atacccctca cagaactaca ttttggggag aaatggttcc acaagaaggt ggagaagagg	1620
acgagtgcg agaaagttgt gcaggaatac tgcatggaga cggggggcaa ggatggcacc	1680
ttcctgggtc gggagagcga gaccttcccc aatgactaca ccctgtcctt ctggcgggtca	1740

ggccgggtcc agcactgccg gatccgctcc accatggagg gcgggaccct gaaatactac	1800
ttgactgaca acctcacctt cagcagcatc tatgccctca tccagcacta ccgcgagacg	1860
cacctgcgct gcgccgagtt cgagctgcgg ctacaggacc ctgtgcccaa ccccaacccc	1920
cacgagtcca agccgtggta ctatgacagc ctgagccgcg gagaggcaga ggacatgctg	1980
atgaggattc cccgggacgg ggccttctcg atccggaagc gagaggggag cgactcctat	2040
gccatcacct tcagggctag gggcaaggta aagcattgtc gcatcaaccg ggacggcccg	2100
cactttgtgc tggggacctc cgcctatctt gagagtctgg tggagctcgt cagttactac	2160
gagaagcatt cactctaccg aaagatgaga ctgcgctacc ccgtgacccc cgagctcctg	2220
gagcgctaca atatggaaag agatataaac tccctctacg acgtcagcag aatgtatgtg	2280
gatcccatg agaatcaatcc gtccatgcct cagagaaccg tgaaagctct gtatgactac	2340
aaagccaagc gaagcgatga gctgagcttc tgccgtgggtg cctcatcca caatgtctcc	2400
aaggagcccc ggggctgggtg gaaaggagac tatggaacca ggatccagca gtacttccca	2460
tccaactacg tcgaggacat ctcaactgca gacttcgagg agctagaaaa gcagattatt	2520
gaagacaatc ccttagggtc tctttgcaga ggaatatagg acctcaatac ctataacgtc	2580
gtgaaagccc ctacgggaaa aaaccagaag tctttgtct tcatcctgga gccaagcag	2640
cagggcgatc ctccggtgga gtttgccaca gacaggggtgg aggagctctt tgagtggttt	2700
cagagcatcc gagagatcac ctggaagatt gacaccaagg agaacaacat gaagtactgg	2760
gagaagaacc agtccatcgc catcgagctc tctgacctgg ttgtctactg caaaccaacc	2820
agcaaaacca aggacaactt agaaaatcct gacttccgag aaatccgctc ctttgtggag	2880
acgaaggctg acagcatcat cagacagaag cccgtcgacc tctgaagta caatcaaaag	2940
ggcctgaccc gcgtctaccc aaagggacaa agagttgact cttcaacta cgacccttc	3000
cgcctctggc tgtgcggttc tcagatgggtg gcaactcaatt tccagacggc agataagtac	3060
atgcagatga atcacgcatt gttttctctc aatgggcgca cgggctacgt tctgcagcct	3120
gagagcatga ggacagagaa atatgaccg atgccaccg agtcccagag gaagatcctg	3180
atgacgtga cagtcaaggt tctcgggtct cgccatctcc ccaaacttgg acgaagtatt	3240
gcctgtccct ttgtagaagt ggagatctgt ggagccgagt atgacaacaa caagttcaag	3300
acgacggttg tgaatgataa tggcctcagc cctatctggg ctccaacaca ggagaaggtg	3360
acatttgaat tttatgaccc aaacctggca tttctgcgct ttgtggttta tgaagaagat	3420
atgttcagcg atccaactt tcttgcctcat gccacttacc ccattaaagc agtcaaatca	3480

ggattcaggt ccgttcctct gaagaatggg tacagcgagg acatagagct ggcttcctc 3540
ctggttttct gtgagatgcg gccagtcctg gagagcgaag aggaacttta ctctctctgt 3600
cgccagctga ggaggcggca agaagaactg aacaaccagc tctttctgta tgacacacac 3660
cagaacttgc gcaatgcca cccggatgcc ctggttaaag agttcagtgt taatgagaac 3720
cagctccagc tgtaccagga gaaatgcaac aagaggttaa gagagaagag agtcagcaac 3780
agcaagtttt actca 3795

<210> 27

<211> 3795

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgtccacca cggatcaatgt agattccctt gcggaatatg agaagagcca gatcaagaga 60
gccctggagc tggggacggt gatgactgtg ttcagcttcc gcaagtcac ccccgagcgg 120
agaaccgtcc aggtgatcat ggagacgagg caggtggcct ggagcaagac cgccgacaag 180
atcgagggct tcttggatat catggaaata aaagaaatcc gcccgaggaa gaactccaaa 240
gatttcgagc gagcaaaaagc agttcgccag aaagaagact gctgcttcac catcctatat 300
ggcactcagt tcgtcctcag cacgctcagc ttggcagctg actctaaaga ggatgcagtt 360
aactggctct ctggcttgaa aatcttacac caggaagcga tgaatgcgtc cacgcccacc 420

attatcgaga gttggctgag aaagcagata tattctgtgg atcaaaccag aagaaacagc 480
atcagtctcc gagagttgaa gaccatcttg cccctgatca actttaaagt gagcagtgcc 540
aagttcctta aagataagtt tgtggaaata ggagcacaca aagatgagct cagctttgaa 600
cagttccatc tcttctataa aaaacttatg tttgaacagc aaaaatcgat tctcgatgaa 660
ttcaaaaagg attcgtccgt gttcatcctg gggaacactg acaggccgga tgcctctgct 720
gtttacctgc atgacttcca gaggtttctc atacatgaac agcaggagca ttgggctcag 780
gatctgaaca aagtccgtga gcggtgaca aagttcatg atgacacat gcgtgaaact 840

gctgagcctt tcttgtttgt ggatgagttc ctcacgtacc tgttttcacg agaaaacagc 900
atctgggatg agaagatga cgcggtggac atgcaggaca tgaacaaccc cctgtctcat 960
tactggatct cctcgtcaca taacacgtac cttacaggtg accagctcgc gagcgagtcg 1020
tccccagaag cttacatccg ctgcctgcgc atgggctgtc gctgcattga actggactgc 1080
tgggacgggc ccgatgggaa gccggtcatc taccatggct ggacgcggac taccaagatc 1140
aagtttgacg acgtcgtgca ggccatcaaa gaccacgcct ttgttacctc gagcttccca 1200

gtgatcctgt ccatcgagga gactgcagc gtggagcaac agcgtcacat ggccaaggcc	1260
ttcaaggaag tatttggcga cctgctgttg acgaagccca cggaggccag tgctgaccag	1320
ctgccctcgc ccagccagct gcgggagaag atcatcatca agcataagaa gctgggcccc	1380
cgaggcgtatg tggatgtcaa catggaggac aagaaggacg aacacaagca acagggggag	1440
ctgtacatgt gggattccat tgaccagaaa tggactcggc actactgcgc cattgccgat	1500
gccaagctgt ccttcagtga tgacattgaa cagactatgg aggaggaagt gccccaggat	1560
atacccccta cagaactaca ttttggggag aaatggttcc acaagaaggt ggagaagagg	1620
acgagtgcgc agaagttgct gcaggaatac tgcatggaga cggggggcaa ggatggcacc	1680
ttcctggttc gggagagcga gaccttcccc aatgactaca ccctgtcctt ctggcggtea	1740
ggccgggtcc agcactgcgc gatccgctcc accatggagg gcgggaccct gaaatactac	1800
ttgactgaca acctcacctt cagcagcatc tatgccctca tccagcacta ccgcgagacg	1860
cacctgcgct gcgccgagtt cgagctgcgg ctacacggacc ctgtgcccaa cccaacccc	1920
cacgagtcca agccgtggtg ctatgacagc ctgagccgcg gagaggcaga ggacatgtctg	1980
atgaggattc cctgggacgg ggccttcctg atccggaagc gagaggggag cgactcctat	2040
gccatcacct tcagggctag gggcaaggta aagcattgtc gcatcaaccg ggacggcccg	2100
cactttgtgc tggggacctc cgctatttt gagagtctgg tggagctcgt cagttactac	2160
gagaagcatt cactctaccg aaagatgaga ctgcgctacc ccgtgacccc cgagctcctg	2220
gagcgtaca atatggaaag agatataaac tccctctacg acgtcagcag aatgtatgtg	2280
gatcccagtg aaatcaatcc gtccatgcct cagagaaccg tgaaagctct gtatgactac	2340
aaagccaagc gaagcgatga gctgagcttc tgccgtggtg ccctcatcca caatgtctcc	2400
aaggagcccc ggggctggtg gaaaggagac tatggaacca ggatccagca gtacttccca	2460
tccaactacg tcgaggacat ctcaactgca gacttcgagg agctagaaaa gcagattatt	2520
gaagacaatc cctiagggtc tctttgcaga ggaatatgg acctcaatac ctataacgtc	2580
gtgaaagccc ctgagggaag aaaccagaag tcctttgtct tcctcctgga gccaagcag	2640
cagggcgatc ctccggtgga gtttgccaca gacagggtgg aggagctctt tgagtgtttt	2700
cagagcatcc gagagatcac ctggaagatt gacaccaagg agaacaacat gaagtactgg	2760
gagaagaacc agtccatcgc catcgagctc tctgacctgg ttgtctactg caaaccaacc	2820
agcaaaacca aggacaactt agaaaatcct gacttccgag aaatccgctc ctttgtggag	2880
acgaaggctg acagcatcat cagacagaag cccgtcgacc tcctgaagta caatcaaaag	2940

ggcctgaccc gcgtctaccc aaaggacaa agagttgact cttcaacta cgacccttc	3000
cgcctctggc tgtgcggttc tcagatgggt gcactcaatt tccagacggc agataagtac	3060
atgcagatga atcacgcatt gttttctctc aatgggcgca cgggctacgt tctgcagcct	3120
gagagcatga ggacagagaa atatgaccg atgccaccg agtcccagag gaagatcctg	3180
atgacgctga cagicaaggt tctcgggtct cgccatctcc ccaaacttgg acgaagtatt	3240
gcctgtccct ttgtagaagt ggagatctgt ggagccgagt atgacaacaa caagttcaag	3300
acgacggttg tgaatgataa tggcctcagc cctatctggg ctccaacaca ggagaagggtg	3360
acatttgaaa tttatgaccc aaacctggca tttctgcgt ttgtggttta tgaagaagat	3420
atgttcagcg atcccaactt tcttgctcat gccacttacc ccattaaagc agtcaaata	3480
ggattcaggt ccgttctct gaagaatggg tacagcgagg acatagagct ggcttccttc	3540
ctggttttct gtgagatgcg gccagtctg gagagcgaag aggaacttta ctctctctgt	3600
cgccagctga ggaggcgca agaagaactg aacaaccagc tctttctgta tgacacacac	3660
cagaacttgc gcaatgcaa cgggatgcc ctggttaaag agttcagtgt taatgagaac	3720
cagctccagc tgtaccagga gaaatgaac aagaggttaa gagagaagag agtcagcaac	3780
agcaagtttt actca	3795
<210> 28	
<211> 3795	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 28	
atgtccacca cggtaaatgt agattccctt gcggaatatg agaagagcca gatcaagaga	60
gccctggagc tggggacggt gatgactgtg ttcagcttcc gcaagtccac ccccgagcgg	120
agaaccgtcc aggtgatcat ggagacgcgg caggtggcct ggagcaagac cgccgacaag	180
atcgagggct tcttgatat catggaaata aaagaaatcc gcccaggga gaactccaaa	240
gatttcgagc gagcaaaagc agttcgccag aaagaagact gctgcttcac catctatat	300
ggcactcagt tegtctcag cacgtcagc ttggcagctg actctaaaga ggatgcagtt	360
aactggctct ctggcttgaa aatcttacac caggaagcga tgaatgcgtc cagccccacc	420
attatcgaga gttggctgag aaagcagata tattctgtgg atcaaaccag aagaaacagc	480
atcagtctcc gagagttgaa gaccatcttg cccctgatca actttaagt gagcagtgcc	540
aagttcctta aagataagtt tgtggaaata ggagcacaca aagatgagct cagctttgaa	600
cagttccatc tcttctataa aaaacttatg ttgaaacagc aaaaatcgat tctcgatgaa	660

ttcaaaaagg attcgtccgt gttcatcctg gggaacactg acaggccgga tgcctctgct	720
gtttacctgc atgacttcca gaggtttctc atacatgaac agcaggagca ttgggctcag	780
gatctgaaca aagtccgtga gcggatgaca aagttcattg atgacaccat gcgtgaaact	840
gctgagcctt tcttgtttgt ggatgagttc ctcacgtacc tgttttcacg agaaaacagc	900
atctgggatg agaagtatga cgcggtggac atgcaggaca tgaacaaccc cctgtctcat	960
tactggatct cctcgtcaca taacacgtac cttacaggtg accagctcgc gagcgagtcg	1020
tccccagaag cttacatccg ctgcctgcgc atgggctgtc gctgcattga actggactgc	1080
tgggacgggc ccgatgggaa gccggtcatc taccatggct ggacgcggac taccaagatc	1140
aagtttgacg acgtcgtgca ggccatcaaa gaccacgcct ttgttacctc gagcttccca	1200
gtgatcctgt ccatcgagga gcactgcagc gtggagcaac agcgtcacat ggccaaggcc	1260
ttcaaggaag tatttggcga cctgctgttg acgaagccca cggaggccag tgcctgaccag	1320
ctgccctcgc ccagccagct gcgggagaag atcatcatca agcataagaa gctgggcccc	1380
cgaggcgatg tggatgtcaa catggaggac aagaaggacg aacacaagca acagggggag	1440
ctgtacatgt gggattccat tgaccagaaa tggactcggc actactgcgc cattgccgat	1500
gccaagctgt ccttcagtga tgacattgaa cagactatgg aggaggaagt gccccaggat	1560
atacccccta cagaactaca ttttggggag aaatggttcc acaagaaggt ggagaagagg	1620
acgagtgccg agaagttgct gcaggaatac tgcatggaga cggggggcaa ggatggcacc	1680
ttcctggttc gggagagcga gaccttcccc aatgactaca ccctgtcctt ctggcgggtca	1740
ggccgggtcc agcactgccg gatccgtcc accatggagg gcgggaccct gaaatactac	1800
ttgactgaca acctcacctt cagcagcatc tatgccctca tccagcacta ccgcgagacg	1860
cacctgcgct gcgccgagtt cgagctcggg ctcacggacc ctgtgcccac ccccaacccc	1920
cacgagtcca agccgtggta ctatgacagc ctgagccgcg gagaggcaga ggacatgctg	1980
atgaggattc cccgggacgg ggccttctctg atccggaagc gagaggggag cgactcctat	2040
gccatcacct tcagggctag gggcaaggta aagcattgtc gcatcaaccg ggacggccgg	2100
cactttgtgc tggggacctt cgcctatttt gagagtctgg tggagctcgt cagtactac	2160
gagaagcatt cactctaccg aaagatgaga ctgcgtacc ccgtgacccc cgagctcctg	2220
gagcgctaca atatggaaag agatataaac tcctctacg acgtcagcag aatgtatgtg	2280
gatcccagtg aaatcaatcc gtccatgcct cagagaaccg tgaaagctct gtatgactac	2340
aaagccaagc gaagcgatga gctgagcttc tgccgtgggtg ccctcatcca caatgtctcc	2400

aaggagcccg ggggctggtg gaaaggagac tatggaacca ggatccagca gtacttccca	2460
tccaactacg tcgaggacat ctcaactgca gacttcgagg agctagaaaa gcagattatt	2520
gaagacaatc ccttaggtgc tctttgcaga ggaatattgg acctcaatac ctataacgtc	2580
gtgaaagccc ctccaggaaa aaaccagaag tcctttgtct tcatcctgga gccaagcag	2640
cagggcgatc ctccggtgga gtttgccaca gacaggggtgg aggagctctt tgagtggttt	2700
cagagcatcc gagagatcac ctggaagatt gacaccaagg agaacaacat gaagtactgg	2760
gagaagaacc agtccatcgc catcgagctc tctgacctgg ttgtctactg caaaccaacc	2820
agcaaaacca aggacaactt agaaaatcct gacttccgag aaatccgctc ctttgtggag	2880
acgaaggctg acagcatcat cagacagaag cccgtcgacc tcctgaagta caatcaaaag	2940
ggcctgaccc gcgtctaccc aaagggacaa agagttgact cttcaacta cgacccttc	3000
cgcctctggc tgtgcggttc tcagatggtg gcactcaatt tccagacggc agataagtac	3060
atgcagatga atcacgcatt gttttctctc aatgggcgca cgggctacgt tctgcagcct	3120
gagagcatga ggacagagaa atatgaccg atgccaccg agtcccagag gaagatcctg	3180
atgacgctga cagtcaaggt tctcggtgct cgccatctcc ccaaacttgg acgaagtatt	3240
gcctgtccct ttgtagaagt ggagatctgt ggagccgagt atgacaacaa caagttcaag	3300
acgacgggtg tgaatgataa tggcctcagc cctatctggg ctccaacaca ggagaagggtg	3360
acatttgaaa tttatgaccc aaacctggca tttctgcgct ttgtggttta tgaagaagat	3420
atgttcagcg atcccaactt tcttctcat gccacttacc ccattaaagc agtcaaatca	3480
ggattcaggt ccgttcctct gaagaatggg tacagcgagg acatagagct ggcttcctc	3540
ctggttttct gtgagatcgc gccagtcctg gagagcgaag aggaacttta ctctctctgt	3600
cgccagctga ggaggcggca agaagaactg aacaaccagc tctttctgta tgacacacac	3660
cagaacttgc gcaatgcaa ccgggatgcc ctggttaaag agttcagtgt taatgagaac	3720
cagctccagc tgtaccagga gaaatgcaac aagaggttaa gagagaagag agtcagcaac	3780
agcaagtttt actca	3795