

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5933459号  
(P5933459)

(45) 発行日 平成28年6月8日(2016.6.8)

(24) 登録日 平成28年5月13日(2016.5.13)

(51) Int.Cl.		F I	
<b>C 1 2 N</b>	<b>15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/19</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/19
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/15</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/15
<b>C 1 2 N</b>	<b>1/21</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 1/21
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 5/10

請求項の数 33 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-555071 (P2012-555071)
(86) (22) 出願日	平成23年2月22日 (2011.2.22)
(65) 公表番号	特表2013-527747 (P2013-527747A)
(43) 公表日	平成25年7月4日 (2013.7.4)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/025645
(87) 国際公開番号	W02011/106298
(87) 国際公開日	平成23年9月1日 (2011.9.1)
審査請求日	平成26年2月10日 (2014.2.10)
(31) 優先権主張番号	61/308, 275
(32) 優先日	平成22年2月25日 (2010.2.25)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	399052796
	ダイナ ファーバー キャンサー インス ティチュート, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O2 215, ポストン, ブルックライン ア ベニュー 450
(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(74) 代理人	100096013 弁理士 富田 博行
(74) 代理人	100092967 弁理士 星野 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BRAF阻害剤に対する耐性を付与するBRAF突然変異

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

BRAF活性を有する突然変異型BRAFポリペプチドをコードする単離された核酸分子であって、前記突然変異型BRAFポリペプチドは、野生型BRAFポリペプチド(配列番号2)またはBRAF V600Eポリペプチド(配列番号4)と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、該少なくとも1つのアミノ酸置換は、突然変異型BRAFポリペプチドに、1種またはそれより多くのBRAF阻害剤に対する耐性を付与し、

前記少なくとも1つのアミノ酸置換は、A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fからなる群より選択される、上記核酸分子。

【請求項2】

前記突然変異型BRAFポリペプチドは、野生型BRAFポリペプチドまたはBRAF V600Eポリペプチドと比較して、1~5個のアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】

前記突然変異型BRAFポリペプチドは、野生型BRAFポリペプチドまたはBRAF V600Eポリペプチドと比較して、1個のアミノ酸置換を有する、請求項1に記載の

10

20

核酸分子。

【請求項 4】

前記突然変異型 B R A F ポリペプチドは、1 またはそれより多くのアミノ酸位置 T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、または、P 6 8 6 Q に置換を含む B R A F ポリペプチドである、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

前記 B R A F 阻害剤は、R A F - 2 6 5 または P L X 4 7 2 0 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の核酸分子。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の核酸を含む発現ベクター。

10

【請求項 7】

請求項 6 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の宿主細胞によって突然変異型 B R A F ポリペプチドが生産されるように、該細胞を培養することを含む、突然変異型 B R A F ポリペプチドの製造方法。

【請求項 9】

B R A F 活性を有する単離された突然変異型 B R A F ポリペプチドであって、ここで前記突然変異型 B R A F ポリペプチドは、野生型 B R A F ポリペプチド (配列番号 2) または B R A F V 6 0 0 E ポリペプチド (配列番号 4) と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、該少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、突然変異型 B R A F ポリペプチドに、1 種またはそれより多くの B R A F 阻害剤に対する耐性を付与し、

20

前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 F からなる群より選択される、上記ポリペプチド。

【請求項 10】

野生型 B R A F ポリペプチドまたは B R A F V 6 0 0 E ポリペプチドと比較して、1 ~ 5 個のアミノ酸置換を有する、請求項 9 に記載の突然変異型 B R A F ポリペプチド。

30

【請求項 11】

野生型 B R A F ポリペプチドまたは B R A F V 6 0 0 E ポリペプチドと比較して、1 個のアミノ酸置換を有する、請求項 9 に記載の突然変異型 B R A F ポリペプチド。

【請求項 12】

前記 B R A F 阻害剤が R A F - 2 6 5 である、請求項 9 ~ 11 のいずれか一項に記載の突然変異型 B R A F ポリペプチド。

【請求項 13】

癌治療において有用な化合物の同定方法であって、該方法は：

( a ) 請求項 9 に記載の突然変異型 B R A F ポリペプチドおよび B R A F 基質を含む分析組成物を提供すること；

40

( b ) 試験化合物の非存在下で B R A F 基質のリン酸化を可能にする条件下で、分析組成物を試験化合物と接触させること；および

( c ) B R A F 基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定すること；  
を含み、ここで適切なコントロールと比較して B R A F 基質のリン酸化がダウンレギュレーションされていれば、その化合物は癌治療において有用な化合物として同定される、上記方法。

【請求項 14】

前記 B R A F 基質が M E K 1 または M E K 2 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 M E K 1 または M E K 2 のリン酸化は、リン酸特異的 M E K 抗体を用いて決定され

50

る、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 MEK1 または MEK2 のリン酸化は、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) のリン酸化を測定することによって決定される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

前記分析組成物は、細胞抽出物である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

癌治療において有用な化合物の同定方法であって、該方法は：

a) 請求項 9 に記載の突然変異型 BRAF ポリペプチドを含む細胞を提供すること；

b) 該細胞を試験化合物と接触させること；および、

c) BRAF 基質のリン酸化に対する試験化合物の作用または細胞増殖に対する試験化合物の作用を決定すること；

を含み、ここで適切なコントロールと比較して BRAF 基質のリン酸化がダウンレギュレーションされているかまたは細胞増殖が減少していれば、その化合物は癌治療において有用な化合物として同定される、上記方法。

【請求項 19】

前記 BRAF 基質は、MEK1 または MEK2 である、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

試験化合物を第二世代の BRAF 阻害剤として同定するための細胞ベースのスクリーニング方法であって、該方法は、請求項 7 に記載の宿主細胞を試験化合物と接触させることを含み、ここで試験化合物に対する宿主細胞の感受性が、第二世代の BRAF 阻害剤としての化合物を同定する、上記方法。

【請求項 21】

前記試験化合物に対する宿主細胞の感受性は、細胞増殖分析、細胞の生存の分析および MEK リン酸化分析からなる群より選択される分析を用いて測定され、ここで試験化合物の存在下において細胞増殖、細胞の生存、または MEK リン酸化における減少がみられた場合、その化合物は第二世代の BRAF 阻害剤として同定される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

第二世代の BRAF 阻害剤の同定方法であって、該方法は：

a) 請求項 1 に記載の突然変異型 BRAF ポリペプチドの三次元結晶または溶液構造を用いたコンピューター支援モデリングによって候補薬を選択すること、

ここで前記突然変異型 BRAF ポリペプチドは、野生型 BRAF ポリペプチドまたは BRAF V600E ポリペプチドと比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、ここで上記少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、突然変異型 BRAF ポリペプチドに、1 種またはそれより多くの BRAF 阻害剤に対する耐性を付与する；

b) 前記候補薬を突然変異型 BRAF ポリペプチドと接触させること；および、

c) 前記候補薬と突然変異型 BRAF ポリペプチドとの相互作用を検出すること；

を含み、ここで突然変異型 BRAF ポリペプチドと相互作用することができる化合物が、第二世代の BRAF 阻害剤として同定される、上記方法。

【請求項 23】

前記試験化合物は、化合物ライブラリーに含まれる化合物である、請求項 13 ~ 22 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

癌を有する被験者を、RAF 阻害剤での治療に耐性を付与する BRAF 突然変異に関してインビトロでスクリーニングする方法であって、該方法は、

被験者から得られた癌細胞を含むサンプル中で野生型 BRAF ポリペプチド (配列番号 1) または BRAF V600E ポリペプチドをコードする核酸分子 (配列番号 3) と比べて 1 種またはそれより多くの突然変異を含む BRAF ポリペプチドをコードする核酸分子を同定すること、

10

20

30

40

50

ここで該突然変異は、A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 F からなる群より選択される B R A F ポリペプチド中の 1 またはそれより多くのアミノ酸をコードする位置で起こる、

を含み、ここで癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、R A F 阻害剤での治療に対して耐性を有すると同定される、上記方法。

【請求項 2 5】

癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、第一世代の B R A F 阻害剤での治療中に、再発を起こす比較的高い危険を有すると同定される、請求項 2 4 に記載の方法。

10

【請求項 2 6】

癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、第一世代の B R A F 阻害剤での治療に対して反応しないと同定される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記第一世代の B R A F 阻害剤は、R A F - 2 6 5 である、請求項 2 5 または 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、M E K 阻害剤または第二世代の B R A F 阻害剤での治療に層別化される、請求項 2 4 に記載の方法。

20

【請求項 2 9】

前記癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在するかどうかは、B R A F ポリペプチドをコードする核酸分子の配列を決定することを含む方法によって決定される、請求項 2 4 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在するかどうかは、A 2 9、H 7 2、S 1 1 3、S 1 2 4、P 1 6 2、C 1 9 4、L 2 2 7、P 2 3 1、C 2 5 1、V 2 9 1、Q 3 2 9、K 4 8 3、L 4 8 5、T 5 2 1、V 5 2 8、D 5 8 7、P 6 5 5、S 6 5 7、S 6 8 3、P 6 8 6、C 6 9 6、L 6 9 7、P 7 2 2、F 7 3 8、および、C 7 4 8 からなる群より選択される位置に突然変異を含む B R A F ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、前記核酸分子によってコードされたポリペプチドを検出することによって決定される、請求項 2 4 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 3 1】

前記 M E K 阻害剤は、C I - 1 0 4 0、A Z D 6 2 4 4、P D 3 1 8 0 8 8、P D 9 8 0 5 9、P D 3 3 4 5 8 1、R D E A 1 1 9、6 - メトキシ - 7 - ( 3 - モルホリン - 4 - イル - プロポキシ ) - 4 - ( 4 - フェノキシ - フェニルアミノ ) - キノリン - 3 - カルボニトリル、および 4 - [ 3 - クロロ - 4 - ( 1 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル - プロポキシ ) - フェニルアミノ ] - 6 - メトキシ - 7 - ( 3 - モルホリン - 4 - イル - プロポキシ ) - キノリン - 3 - カルボニトリル からなる群より選択される、請求項 2 8 に記載の方法。

40

【請求項 3 2】

前記癌は、黒色腫、白血病、リンパ腫、骨髄腫、癌腫、転移性癌、肉腫、腺腫、神経系癌、および、尿生殖器癌からなる群より選択される、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記癌は、黒色腫である、請求項 2 8 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、癌の化学療法に対する突然変異によって生じる耐性に関する。

## (関連出願

本願は、2010年2月25日付けで出願された米国特許出願第61/308,275号の優先権を主張する。この出願の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

## 【0002】

政府支援

本発明は、国立健康研究所 (National Institutes of Health) によって付与された認可番号 K08CA115927 の政府支援のもとでなされた。本発明において政府が一定の権利を有する。) 10

## 【背景技術】

## 【0003】

癌治療は、現代医学における最大の課題の一つである。癌に伴う症状を治療または軽減する有効な手段は典型的には化学療法剤であるが、場合によっては治療中に1種またはそれより多くの化学療法剤に対する耐性が出現することもある。結果として、特定の個体においてある種の化学療法剤は効果がないものになる。様々な種類の癌における耐性の発生に關与する分子メカニズムはよくわかっていない。薬剤耐性を効果的に回避する治療法を見出すためには、特定の物質に対して耐性を引き起こすメカニズムの解明が必須である。

## 【発明の概要】

## 【0004】

本発明は、癌の化学療法に対する突然変異によって生じる耐性に関する。具体的な実施態様において、本発明は、RAFポリペプチド(例えばBRAFPoliペプチド)やRAFポリペプチドをコードする核酸分子において同定された突然変異を対象とする。これらの突然変異は、治療において現在使用されるRAF阻害剤に耐性を付与する。これらの突然変異を同定することにより、1またはそれより多くの突然変異(例えば本明細書において説明される突然変異)を含むRAFポリペプチドに対する活性を示す第二世代のRAF阻害剤の開発が可能になる。このような第二世代のRAF阻害剤は、癌治療などの様々な臨床用途および治療用途において有用である。 20

## 【0005】

従って、本発明は、第一の形態において、BRAFPoli活性を有する突然変異型BRAFPoliポリペプチドをコードする単離された核酸分子を特徴とし、ここで前記突然変異型BRAFPoliポリペプチドは、野生型BRAFPoliポリペプチド(配列番号2)またはBRAFPoli V600Eポリペプチド(配列番号4)と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、ここでこのアミノ酸置換のうち少なくとも1種は、突然変異型BRAFPoliポリペプチドに、1種またはそれより多くのBRAFPoli阻害剤に対する耐性を付与する。この形態の所定の実施態様において、上記アミノ酸置換のうち少なくとも1種は、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸位置:A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748で起こる。代表的な実施態様において、上記アミノ酸置換のうち少なくとも1種は、以下に示すもののうち1種またはそれより多く:A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fである。 30 40

## 【0006】

前述の形態の一実施態様において、突然変異型BRAFPoliポリペプチドは、野生型BRAFPoliポリペプチドまたはBRAFPoli V600Eポリペプチドと比較して、1~5個のアミノ酸置換を有する。代表的な実施態様において、突然変異型BRAFPoliポリペプチドは、1個 50

のアミノ酸置換を有する。その他の代表的な実施態様において、突然変異型 B R A F ポリペプチドは、以下に示す 1 種またはそれより多くの配列番号 2 または配列番号 4 のアミノ酸位置：V 5 2 8、T 5 2 1、および/または、P 6 8 6 に置換を含む B R A F である。前述の形態のいくつかの実施態様において、B R A F 阻害剤は、R A F - 2 6 5 である。

【 0 0 0 7 】

突然変異型 R A F ポリペプチドをコードする単離された核酸分子は、発現ベクターに挿入させ、宿主細胞で発現させることができる。従って、その他の形態において、本発明は、本明細書に記載の核酸分子を含む発現ベクターを特徴とする。その他の形態において、本発明は、前述の発現ベクターを含む宿主細胞を特徴とする。その他の形態において、本発明は、突然変異型 B R A F ポリペプチドの製造方法を特徴とし、本方法は、突然変異型 B R A F ポリペプチドが宿主細胞によって生産されるように、突然変異型 B R A F ポリペプチドをコードする発現ベクターを含む宿主細胞を培養すること、を含む。

【 0 0 0 8 】

その他の実施態様において、本発明は、単離した突然変異型 B R A F ポリペプチドを特徴とし、ここで突然変異型 B R A F ポリペプチドは、野生型 B R A F ポリペプチド（配列番号 2）または B R A F V 6 0 0 E ポリペプチド（配列番号 4）と比較して、少なくとも 1 つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、ここでこのアミノ酸置換のうち少なくとも 1 種は、突然変異型 B R A F ポリペプチドに、1 種またはそれより多くの B R A F 阻害剤に対する耐性を付与する。好ましい実施態様において、単離した突然変異型 B R A F ポリペプチドは、野生型 B R A F ポリペプチドの活性を有する。前述の形態の一実施態様において、上記アミノ酸置換のうち少なくとも 1 種は、以下から選択される 1 種またはそれより多くのアミノ酸位置：A 2 9、H 7 2、S 1 1 3、S 1 2 4、P 1 6 2、C 1 9 4、L 2 2 7、P 2 3 1、C 2 5 1、V 2 9 1、Q 3 2 9、K 4 8 3、L 4 8 5、T 5 2 1、V 5 2 8、D 5 8 7、P 6 5 5、S 6 5 7、S 6 8 3、P 6 8 6、C 6 9 6、L 6 9 7、P 7 2 2、F 7 3 8、および、C 7 4 8 で起こる。代表的な実施態様において、上記アミノ酸置換のうち少なくとも 1 種は、A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 F から選択される。いくつかの実施態様において、突然変異型 B R A F ポリペプチドは、野生型 B R A F ポリペプチドまたは B R A F V 6 0 0 E ポリペプチドと比較して、1 ~ 5 個のアミノ酸置換を有する。代表的な実施態様において、突然変異型 B R A F ポリペプチドは、野生型 B R A F ポリペプチドと比較して、1 個のアミノ酸置換を有する。前述の形態のその他の代表的な実施態様において、B R A F 阻害剤は、R A F - 2 6 5 である。

【 0 0 0 9 】

その他の形態において、本発明は、癌治療において有用な化合物の同定方法を特徴とし、本方法は、突然変異型 B R A F ポリペプチドと B R A F 基質とを含む分析組成物を提供すること、試験化合物の非存在下で B R A F 基質のリン酸化を可能にする条件下で、分析組成物を試験化合物と接触させること、および、B R A F 基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定すること、を含み、ここで適切なコントロールと比較して B R A F 基質のリン酸化がダウンレギュレーションされていれば、その化合物は癌治療において有用な化合物として同定される。いくつかの実施態様において、分析組成物は、細胞抽出物である。

【 0 0 1 0 】

その他の形態において、本発明は、化合物を第二世代の B R A F 阻害剤として同定する方法を特徴とし、本方法は、突然変異型 B R A F ポリペプチドと B R A F 基質とを含む分析組成物を提供すること、試験化合物の非存在下で B R A F 基質のリン酸化を可能にする条件下で、分析組成物を試験化合物と接触させること、および、B R A F 基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定すること、を含み、ここで適切なコントロールと比較し

10

20

30

40

50

てB R A F基質のリン酸化がダウンレギュレーションされていれば、その化合物は第二世代のB R A F阻害剤として同定される。いくつかの実施態様において、分析組成物は、細胞抽出物である。

【0011】

その他の形態において、本発明は、癌治療において有用な化合物の同定方法を特徴とし、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む細胞を提供すること、該細胞を試験化合物と接触させること、および、B R A F基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定することを含み、ここで適切なコントロールと比較してB R A F基質のリン酸化がダウンレギュレーションされていれば、その化合物は癌治療において有用な化合物として同定される。

10

その他の形態において、本発明は、第二世代のB R A F阻害剤である化合物の同定方法を特徴とし、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む細胞を提供すること、該細胞を試験化合物と接触させること、および、B R A F基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定することを含み、ここで適切なコントロールと比較してB R A F基質のリン酸化がダウンレギュレーションされていれば、その化合物は第二世代のB R A F阻害剤として同定される。

【0012】

前述の形態の一実施態様において、B R A F基質は、M E K 1またはM E K 2である。代表的な実施態様において、M E K 1またはM E K 2のリン酸化は、リン酸特異的M E K抗体を用いて決定される。その他の代表的な実施態様において、M E K 1またはM E K 2のリン酸化は、ミエリン塩基性タンパク質(M B P)のリン酸化を測定することによって決定される。その他の代表的な実施態様において、M E K 1またはM E K 2のリン酸化は、E R K 1またはE R K 2のリン酸化を測定することによって決定される。

20

【0013】

その他の形態において、本発明は、癌治療において有用な化合物の同定方法を特徴とし、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む細胞を提供すること、該細胞を試験化合物と接触させること、および、細胞増殖に対する試験化合物の作用を決定することを含み、ここで適切なコントロールと比較して細胞増殖が減少してあれば、その化合物は癌治療において有用な化合物として同定される。

【0014】

その他の形態において、本発明は、第二世代のB R A F阻害剤である化合物の同定方法を特徴とし、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む細胞を提供すること、該細胞を試験化合物と接触させること、および、細胞増殖に対する試験化合物の作用を決定することを含み、ここで適切なコントロールと比較して細胞増殖が減少してあれば、その化合物は第二世代のB R A F阻害剤として同定される。

30

【0015】

その他の形態において、本発明は、試験化合物を第二世代のB R A F阻害剤として同定するための細胞ベースのスクリーニング方法を特徴とし、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む宿主細胞を試験化合物と接触させること、を含み、ここで適切なコントロールと比較して宿主細胞が試験化合物に対して感受性を有すれば、その化合物は第二世代のB R A F阻害剤として同定される。一実施態様において、このような試験化合物に対する宿主細胞の感受性は、細胞増殖分析、細胞の生存の分析およびM E Kリン酸化分析からなる群より選択される分析を用いて測定され、ここで試験化合物の存在下において細胞増殖の減少、細胞の生存またはM E Kリン酸化がみられた場合、その化合物は第二世代のB R A F阻害剤として同定される。

40

【0016】

その他の形態において、本発明は、第二世代のB R A F阻害剤の同定方法を提供し、本方法は、コンピューター支援の突然変異型B R A Fポリペプチドの三次元結晶または溶液構造を用いたモデリングによって見込みのある薬物を選択すること(ここで前記突然変異型B R A Fポリペプチドは、野生型B R A FポリペプチドまたはB R A F V 6 0 0 Eポ

50

リペプチドと比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含み、ここで上記アミノ酸置換のうち少なくとも1種は、突然変異型BRAFPオリペプチドに、1種またはそれより多くのBRAFP阻害剤に対する耐性を付与する)；前記見込みのある薬物を突然変異型BRAFPオリペプチドと接触させること；および、前記見込みのある薬物と突然変異型BRAFPオリペプチドとの相互作用を検出すること；を含み、ここで突然変異型BRAFPオリペプチドと相互作用することができる化合物が、第二世代のBRAFP阻害剤として同定される。一実施態様において、試験化合物は、化合物ライブラリーに含まれるものである。

【0017】

その他の形態において、本発明は、第二世代のBRAFP阻害剤である単離された化合物、または、癌治療において有用な化合物を特徴とし、ここで本化合物は、本明細書において説明される方法に従って第二世代のBRAFP阻害剤または癌治療において有用な化合物として同定される。

10

【0018】

その他の形態において、本発明は、突然変異型BRAFPオリペプチドの活性を阻害する方法を特徴とし、本方法は、突然変異型BRAFPオリペプチドを、第二世代のBRAFP阻害剤である化合物と接触させることを含む。前述の形態の好ましい実施態様において、本化合物はさらに、野生型BRAFPオリペプチドおよび/またはBRAFPV600Eオリペプチドの活性を阻害する。いくつかの実施態様において、突然変異型BRAFPオリペプチドを第二世代のBRAFP阻害剤と接触させることは、インビトロで起こる。その他の実施態様において、上記接触は、インビボで起こる。代表的な実施態様において、上記接触は被験者中で起こり、例えば癌を有する被験者中で起こる。いくつかの実施態様において、被験者は、RAF-265での治療後に再発を起こしている。代表的な実施態様において、癌は黒色腫である。

20

【0019】

その他の形態において、本発明は、被験者における癌の治療方法を特徴とし、本方法は、被験者に第二世代のBRAFP阻害剤である化合物を投与すること、を含む。代表的な実施態様において、癌は、BRAFP中に1またはそれより多くの突然変異を含み、ここで上記1またはそれより多くの突然変異は、BRAFPオリペプチドにRAF-265に対する耐性を付与する。前述の形態の好ましい実施態様において、本化合物はさらに、野生型BRAFPオリペプチドおよび/またはBRAFPV600Eオリペプチドの活性を阻害する。いくつかの実施態様において、被験者は、RAF-265での治療後に再発を起こしている。代表的な実施態様において、癌は黒色腫である。

30

【0020】

その他の形態において、本発明は、癌を有する被験者を、RAF阻害剤での治療に耐性を付与するBRAFP突然変異に関してスクリーニングする方法を特徴とし、本方法は、被験者から癌細胞を含むサンプルを得ること、および、サンプル中で野生型BRAFPオリペプチド(配列番号1)またはBRAFPV600Eオリペプチドをコードする核酸分子(配列番号3)と比べて1またはそれより多くの突然変異を含むBRAFPオリペプチドをコードする核酸分子を同定すること、を含み、ここで該突然変異は、A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択されるBRAFPオリペプチド中の1またはそれより多くのアミノ酸をコードする位置で起こり、ここで癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、RAF阻害剤での治療に対して耐性を有すると同定される。代表的な実施態様において、このような核酸分子は、野生型BRAFPオリペプチド(配列番号2)またはBRAFPV600Eオリペプチド(配列番号4)と比べて、A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D58

40

50

7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 F からなる群より選択される 1 またはそれより多くのアミノ酸置換を有する B R A F ポリペプチドをコードする。いくつかの実施態様において、癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、第一世代の B R A F 阻害剤での治療中に、再発を起こす比較的高い危険を有すると同定される。その他の実施態様において、癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在する場合、その被験者は、第一世代の B R A F 阻害剤での治療に対して反応しないと同定される。代表的な実施態様において、第一世代の B R A F 阻害剤は、R A F - 2 6 5 である。いくつかの実施態様において、癌細胞を含むサンプル中に上記核酸分子が存在する場合、その被験者は第二世代の B R A F 阻害剤での治療に対して反応するものと層別化される。代表的な実施態様において、癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在するかどうかは、B R A F ポリペプチドをコードする核酸分子の配列を決定することを含む方法によって決定される。その他の実施態様において、癌細胞を含むサンプル中にこのような核酸分子が存在するかどうかは、A 2 9、H 7 2、S 1 1 3、S 1 2 4、P 1 6 2、C 1 9 4、L 2 2 7、P 2 3 1、C 2 5 1、V 2 9 1、Q 3 2 9、K 4 8 3、L 4 8 5、T 5 2 1、V 5 2 8、D 5 8 7、P 6 5 5、S 6 5 7、S 6 8 3、P 6 8 6、C 6 9 6、L 6 9 7、P 7 2 2、F 7 3 8、および、C 7 4 8 からなる群より選択される位置に突然変異を含む B R A F ポリペプチドを特異的に認識する抗体を用いて、上記核酸分子によってコードされたポリペプチドを検出することによって決定される。代表的な実施態様において、前述の形態で説明される方法は、1 またはそれより多くの突然変異型 B R A F の突然変異の存在が検出された被験者に第二世代の B R A F 阻害剤を投与すること、をさらに含む。

10

20

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0021】

【図1】図1は、野生型ヒト B R A F (配列番号1) (NCBI 参照配列番号: NM\_004333.4; gi187608632) のヌクレオチド配列を示す。

【図2】図2は、野生型ヒト B R A F (配列番号2) (NCBI 参照配列番号: NP\_004324.2; gi33188459) のポリペプチド配列を示す。

【図3】図3は、ヒト B R A F V 6 0 0 E のヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す。V 6 0 0 E アミノ酸置換を構成する、野生型 B R A F 配列と比べてチミジンがアデノシンに転換したところは下線で示した。

30

【図4】図4は、ヒト B R A F V 6 0 0 E のポリペプチド配列 (配列番号4) を示す。野生型 B R A F 配列に対する V 6 0 0 E 置換は下線で示した。

【図5】図5は、R A F 2 6 5 の選択による B R A F 突然変異の全体像を示す。高頻度の突然変異の結果として起こるアミノ酸置換を示す。

【図6】図6は、P L X 4 7 2 0 の選択による B R A F 突然変異の全体像を示す。高頻度の突然変異の結果として起こるアミノ酸置換を示す。

【図7】図7は、R A F 2 6 5 と P L X 4 7 2 0 両方のスクリーニングに共通する3つのアミノ酸置換の構造的な位置を示す。

【図8】図8は、B R A F - 野生型、B R A F - V 6 0 0 E、B R A F - V 6 0 0 E - T 5 2 1 K、B R A F - V 6 0 0 E - V 5 2 8 F、または、B R A F - V 6 0 0 E - P 6 8 6 Q を含む細胞中の P L X 4 7 2 0 濃度を増加させながら処理した、B R A F、p - M E K 1 / 2 および p - E R K 1 / 2 レベルの免疫プロット実験の結果を示す。

40

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0022】

#### I. B R A F の生物活性

R A F タンパク質ファミリーには3つの種が含まれる: B R A F、A R A F、および、C R A F (また、R A F - 1 としても知られている)。これらの R A F タンパク質はそれぞれ、アミノ末端の調節ドメイン、活性化ループ、および、C 末端キナーゼドメインを含む。R A F の調節は、調節ドメインおよび触媒ドメインのリン酸化を含む。活性化された

50

ら、R A F分子は、リン酸化によって下流のシグナル伝達分子を活性化することができるセリン/スレオニンキナーゼとして機能する。

【0023】

R A Fは、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(M A P K)シグナル伝達経路と連結することによって細胞増殖を促進することに関与する。具体的に言えば、R A Fタンパク質は、R a s 介在シグナル伝達の発端となるエフェクターである。活性化されたR a s はR A Fと直接相互作用し、細胞質から細胞膜にR A Fを補充する。細胞膜へのトランスロケーションの際に、R a s 結合型R A Fは、R A Fセリン/スレオニンキナーゼ活性を活性化するのに役立つ一連のリン酸化現象およびコンフォメーション変化を受けない。またR A Fは、インターフェロンベータ、プロテインキナーゼC(P K C)アルファ、B c 1 - 2のような抗アポトーシスタンパク質、様々な足場タンパク質、紫外光、電離放射線、レチノイド、エリスロポイエチン、および、R A Fアイソフォーム間の二量体化などが関与する、R a s とは独立した経路を介して活性化される場合もある。

10

【0024】

R A Fは、一度活性化されたら、R A Fによる認識を可能にするプロリンリッチな配列を含むキナーゼM E K 1およびM E K 2をリン酸化することによって下流のシグナル伝達を仲介する。B R A Fは、A R A FまたはR A F - 1のどちらよりも相当有効なM E K 1およびM E K 2のアクチベーターである。M E K 1およびM E K 2は順にE R K 1およびE R K 2をリン酸化して活性化し、続いてそれらを細胞核に転移させる。核のE R K 1およびE R K 2はE l k - 1、F o s、J u n、A P - 1およびM y cなどの転写因子を活性化し、最終的に例えばサイクリンD 1、サイクリンE、および、c d cアクチベーター2 5ホスファターゼなどの細胞増殖、脱分化および生存に関与する遺伝子の転写を誘導する。

20

【0025】

R A F中の活性化突然変異の存在またはR a s を介する異常なシグナル伝達のどちら原因でも、R A Fシグナル伝達のアップレギュレーションは、前述のシグナルカスケードの活性化、その結果としての細胞増殖および生存の増加によって腫瘍形成を促進する。R A Fポリペプチド、特にB R A F中の活性化突然変異は、高頻度でヒト癌に関連している。このようなB R A F突然変異の1つは単一のチミジンからアデノシンへの転換であり、それによりアミノ酸6 0 0位においてバリンがグルタミン酸に変換される。黒色腫のケースのおよそ3分の2がこの腫瘍形成性のB R A F V 6 0 0 E突然変異を有しており、この突然変異は、M A P Kシグナル伝達の活性化を介してメラニン細胞の形質転換に関与している。その他様々なタイプの癌、例えば、これらに限定されないが、結腸、卵巣および甲状腺癌なども同様に、B R A F V 6 0 0 E突然変異を含む。従って、R A Fを標的化すること、具体的にはB R A F V 6 0 0 Eを標的化することが癌治療に有望なアプローチとなる。B R A Fは、そのM E K 1およびM E K 2基質に関して示される高度な特異性のために治療にとって魅力的な標的である。現在のところ様々なB R A F阻害剤が臨床開発中である。このような阻害剤の1つは化合物R A F - 2 6 5であり、これは、3種全てのR A Fアイソフォームに加えて、B R A F V 6 0 0 Eに対しても効果的である。R A F - 2 6 5は臨床的に有望であることから、R A Fの標的化は将来見込みのある癌治療法である。

30

40

【0026】

本明細書において同じ意味で用いられる用語「R A F活性」、「R A F生物活性」および「R A Fの機能的な活性」は、標準的な技術に従ってインビボまたはインビトロで決定されるような、R A F反応性の細胞または組織(例えば癌細胞または癌)に対して、または、R A Fの標的分子に対して、R A Fタンパク質(例えばB R A F)によって発揮される活性を含む。R A F活性は、直接的な活性であってもよく、例えばR A F標的分子(例えばM E K 1またはM E K 2)との結合、または、R A F基質(例えばM E K 1またはM E K 2)のリン酸化であってもよい。あるいはR A F活性は、間接的な活性であってもよく、例えばR A Fタンパク質とR A F標的分子(例えばM E K 1またはM E K 2)との相

50

相互作用が介在する下流の生物学的な事象であってもよい。RAFはMEK1およびMEK2が関与するシグナル伝達経路中に存在することから、このような下流の生物学的な現象としては、これらに限定されないが、例えばMBPのリン酸化、ERK1またはERK2のリン酸化、ERK1またはERK2標的遺伝子の調節の変化、および、細胞増殖または生存の変化が挙げられる。

【0027】

II. BRAF耐性突然変異 (resistance mutation)

RAF阻害剤、例えばBRAF阻害剤での癌治療は有望な治療アプローチであるが、このような治療を受ける患者のなかには再発したりまたは治療に反応を示さない場合もあり、その結果として患者の病気は進行する。本明細書において説明されているように、本発明は、現在のところ臨床開発中のRAF阻害剤に耐性を付与するBRAFにおける突然変異の発見に関する。このような突然変異が癌細胞に取り込まれていれば、その患者は所定のRAF阻害剤での治療に対して耐性を示す。代表的な実施態様において、本発明は、RAF阻害剤のRAF-265に対する耐性の発達に関する。

【0028】

(A) RAF阻害剤に対する耐性を付与するBRAF突然変異の同定

様々な実施態様において、本発明は、RAF活性を阻害する薬物に対するBRAFポリペプチドの耐性を付与する、BRAFポリペプチドにおける突然変異、または、BRAFポリペプチドをコードする核酸分子における突然変異を同定する方法に関する。「突然変異型BRAFポリペプチド」は、本明細書において述べられるように、1またはそれより多くの既知のBRAF阻害剤に対する耐性を付与する、1種またはそれより多くの突然変異を含むBRAFポリペプチドを含む。BRAF阻害剤に対する耐性を付与する上記1種またはそれより多くの突然変異に加えて、突然変異型BRAFポリペプチドは、V600E置換を含んでいてもよい。野生型BRAFポリペプチド配列と比べてV600E置換のみを含み、それ以外の突然変異をまったく含まないBRAFポリペプチドは、本明細書において定義される「突然変異型BRAFポリペプチド」とはみなされない。「突然変異型BRAF核酸分子」は、本明細書において述べられるように、突然変異型BRAFポリペプチドをコードする核酸分子を含む。1またはそれより多くの突然変異を含むBRAFポリペプチドをコードする核酸分子は、当業界でよく知られている様々な適切な方法を用いて作製することができ、このような方法としては、例えば、野生型BRAF核酸配列またはBRAF V600E核酸配列のランダム変異誘発もしくは部位特異的変異誘発が挙げられ、これらの方法は、大腸菌(E. coli)で行うことができる。代表的な実施態様において、野生型BRAF核酸配列は、ヒト野生型BRAF核酸配列(配列番号1)であり、BRAF V600E核酸配列は、ヒトBRAF V600E核酸配列(配列番号3)である。続いて、RAF阻害剤での治療に対して耐性を有する突然変異型BRAFポリペプチドをコードする核酸を同定するために、BRAF阻害剤での治療に対して別の方法で感受性を有する細胞中で突然変異型BRAF核酸分子をスクリーニングしてもよい。

【0029】

突然変異型BRAF核酸および突然変異型BRAFポリペプチドを、RAF阻害剤(例えばRAF-265)での治療に対する耐性に関してスクリーニングするために、様々な適切な方法を使用することができる。いずれの場合においても、RAF阻害剤での治療に対して耐性を有する突然変異型BRAFポリペプチドは、RAF阻害剤の存在下で野生型BRAFポリペプチドまたはBRAF V600Eポリペプチドが示すよりも、RAF阻害剤の存在下でより大きいBRAF活性を示す。1つの典型的な方法において、突然変異型BRAFポリペプチドをコードする核酸分子は、RAF阻害剤での治療に対して別の方法で感受性を有する細胞中で発現させることができる。この目的において有用な典型的な細胞系は、黒色腫細胞系A375である。突然変異型BRAFポリペプチドを発現させた後、細胞をRAF阻害剤で処理することができる。続いて突然変異型BRAFポリペプチドの活性を測定して、同様に発現させてRAF阻害剤で治療した野生型BRAFポリペプチド(またはBRAF V600Eポリペプチド)の活性と比較してもよい。

## 【 0 0 3 0 】

B R A Fポリペプチドの活性は、例えばB R A F阻害剤での治療した後に細胞の増殖または生存を測定することによって決定することができ、ここで増殖または生存は、B R A F活性と決定的な相関を有する。細胞増殖、増殖または生存は、当業界でよく知られているあらゆる適切な方法を用いて決定することができる。一実施態様において、細胞増殖は、M T SまたはセルタイターG L o (Cell Titer GLo)のようなウェルベースの細胞増殖/生存分析を用いて決定することができ、ここでR A F阻害剤の存在下における細胞増殖は、R A F阻害剤の非存在下で培養した未処理細胞で観察された細胞増殖に対するパーセンテージとして示される。所定の実施態様において、耐性とは、G I 5 0値における、適切なコントロールと比較して少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍、最も好ましくは少なくとも4～5倍のシフトと定義される。その他の実施態様において、耐性は、約1 μMのG I 5 0値と定義される。またB R A Fポリペプチド活性は、例えばB R A F阻害剤での治療した後に細胞中に存在するリン酸化されたM E K 1 / 2またはE R K 1 / 2の相対量を決定することによっても測定することができる。また野生型または突然変異型B R A Fポリペプチドの活性は、インビトロでのリン酸化分析を用いて決定することもでき、ここでB R A F活性は、B R A F阻害剤での治療した後の分析物中のリン酸化されたM E K 1 / 2またはE R K 1 / 2の比率を測定することによって決定される。上述したように、M E K 1 / 2はB R A Fの基質であるが、E R K 1 / 2はM E K 1 / 2の基質であり、これはB R A F活性の下流の指標として役立つ。R A F阻害剤での治療後に野生型B R A FポリペプチドまたはB R A F V 6 0 0 Eポリペプチドよりも大きい活性を有する突然変異型B R A Fポリペプチドは、R A F阻害剤に対する耐性を付与する突然変異を含むと同定される。続いてこのようなR A F阻害剤に対する耐性を付与する突然変異は、突然変異型B R A Fポリペプチドをコードする核酸を配列解析すること、または、突然変異型B R A Fポリペプチドを直接配列解析することによって同定することができる。

## 【 0 0 3 1 】

## ( B ) R A F - 2 6 5 に対する耐性を付与するB R A F突然変異

前述の方式で、ヒトB R A Fポリペプチド中の、突然変異したするとR A F阻害剤R A F - 2 6 5に対する耐性を付与するアミノ酸残基をいくつか同定した。このようなアミノ酸残基としては、以下に示すアミノ酸残基の1種またはそれより多く：A 2 9、H 7 2、S 1 1 3、S 1 2 4、P 1 6 2、C 1 9 4、L 2 2 7、P 2 3 1、C 2 5 1、V 2 9 1、Q 3 2 9、K 4 8 3、L 4 8 5、T 5 2 1、V 5 2 8、D 5 8 7、P 6 5 5、S 6 5 7、S 6 8 3、P 6 8 6、C 6 9 6、L 6 9 7、P 7 2 2、F 7 3 8、および、C 7 4 8が挙げられる。本発明の所定の実施態様において、突然変異型B R A Fポリペプチドは、これらのアミノ酸残基のうち1種またはそれより多くにおいて、野生型ヒトB R A Fポリペプチド配列（またはB R A F V 6 0 0 Eポリペプチド配列）と比べて突然変異を含む。関連する実施態様において、突然変異型B R A F核酸分子は、これらのアミノ酸残基の1種またはそれより多くをコードする1種またはそれより多くのヌクレオチドにおいて、野生型ヒトB R A F核酸配列（またはB R A F V 6 0 0 Eポリペプチド配列）と比べて突然変異を含む。代表的な実施態様において、本明細書において具体的に述べられた突然変異型B R A Fポリペプチドは、以下に示す1種またはそれより多くの耐性突然変異：A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 Fを含む。その他の代表的な実施態様において、本明細書において具体的に述べられた突然変異型B R A Fポリペプチドをコードする突然変異型B R A F核酸分子は、以下に示す1種またはそれより多くの耐性突然変異：A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、

10

20

30

40

50

および、C748Fを含む。

【0032】

本発明の突然変異型BRAF核酸分子および突然変異型BRAFポリペプチドは、本明細書において説明されたものに加えてその他の突然変異を含んでもよい。例えば本発明の突然変異型BRAFポリペプチドは、アミノ酸残基A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748における1またはそれより多くの突然変異に加えて、その他のアミノ酸残基に突然変異を含んでもよい。いずれのケースにおいても、本発明の突然変異型BRAFポリペプチドはBRAF活性を有し、さらに本発明の突然変異型BRAF核酸分子は、BRAF活性を有するポリペプチドをコードする。代表的な実施態様において、本発明の突然変異型BRAF分子は、アミノ酸残基A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748における1またはそれより多くの突然変異に加えて、アミノ酸残基V600に突然変異を有する。一実施態様において、V600における突然変異は、活性化突然変異であり、例えばV600E突然変異である。RAF阻害剤のRAF-265は、V600E活性化突然変異を含むBRAFの活性を効果的に阻害した。この突然変異は高いパーセンテージで腫瘍中に存在しており、例えば黒色腫の場合はそのうちおよそ3分の2に存在する。本明細書において説明されるBRAF耐性突然変異は、RAF-265のようなRAF阻害剤に対する耐性をBRAF-V600E対立遺伝子に付与する。従って、BRAF-V600Eを含む腫瘍を有する患者は、RAF-265のような第一世代のBRAF阻害剤での治療中に、以下の部位のいずれか：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に第二のBRAF突然変異が生じることにより、再発する危険性がある。

【0033】

本明細書において説明されているように、BRAF阻害剤に対する耐性を付与するBRAF中の突然変異を同定することによって、1またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFタンパク質を阻害するのに効果的な「第二世代のRAF阻害剤」の設計およびスクリーニングが可能になる。このような第二世代のRAF阻害剤は、多くの臨床および治療用途において有用であり、例えば癌治療において有用である。またBRAFポリペプチドにおける耐性突然変異を同定することによっても、癌に1種またはそれより多くのBRAF耐性突然変異が存在するかまたは存在しないかを決定するための癌患者のスクリーニングが可能になる。癌に1種またはそれより多くのBRAF耐性突然変異が存在するかまたは存在しないかを決定することによって、癌患者の治療計画の変更も可能になる。例えば、癌患者から得られた癌細胞を含むサンプル中の本明細書において説明される1種またはそれより多くのBRAF耐性突然変異の同定は、患者を第二世代のRAF阻害剤での治療に層別化するのに用いることができる。同様に、癌を有する患者から得られた癌細胞を含むサンプル中の本明細書において説明される1種またはそれより多くのBRAF耐性突然変異の同定は、患者をMEK阻害剤での治療に層別化するのに用いることができる。またBRAF耐性突然変異の同定は、高い再発の危険がある患者、または、所定のRAF阻害剤での治療に反応しない患者のスクリーニングおよび同定も可能にする。

【0034】

III. 第二世代のBRAF阻害剤を同定する方法

BRAF耐性突然変異の同定により、「第二世代のRAF阻害剤」の開発および/または同定が可能になる。本明細書で用いられるように、第二世代のRAF阻害剤は、本明細書において説明される1またはそれより多くの突然変異を含む、RAFポリペプチド、例

10

20

30

40

50

例えばBRAFPオリペプチドの活性を効果的に阻害する物質である。第二世代のRAF阻害剤は、突然変異型RAFオリペプチドに加えて、野生型RAFオリペプチドの活性を阻害する場合もあるし、阻害しない場合もある。好ましい実施態様において、第二世代のRAF阻害剤は、BRAFFV600Eオリペプチド（配列番号4）の活性を阻害し、同様に、追加で本明細書において説明される1種またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFFV600Eオリペプチドの活性も阻害する。代表的な実施態様において、第二世代のRAF阻害剤は、以下に示すアミノ酸残基の1種またはそれより多く：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に突然変異を含むBRAFPオリペプチドの活性を阻害する。

10

## 【0035】

従って、本発明は、試験化合物を第二世代のRAF阻害剤として同定するための方法を提供する。一実施態様において、非突然変異型BRAFPオリペプチド（例えば野生型BRAFPオリペプチド、または、BRAFFV600Eオリペプチド）と比較して、化合物の存在または非存在下におけるRAF突然変異型BRAFPオリペプチドの相対的な活性を決定することによって、その化合物を第二世代のRAF阻害剤として同定することができる。第二世代のRAF阻害剤である化合物が存在する場合、突然変異型BRAFPオリペプチドは、化合物が存在しない場合よりも低いレベルのRAF活性を有する。第二世代のRAF阻害剤ではない化合物が存在する場合、突然変異型BRAFPオリペプチドは、化合物が存在しない場合と等価体かまたはそれよりも高いレベルのRAF活性を有する。所定の実施態様において、RAF活性は、インビトロの組換えBRAFPオリペプチドを用いた分析で測定することができる。その他の実施態様において、RAF活性は、インビボのBRAFPオリペプチドを発現する培養細胞または実験動物を用いた分析で測定することができる。

20

## 【0036】

BRAF活性の指標は、化合物が第二世代のRAF阻害剤であるかどうかを決定するのに適していればどのようなものでもよい。代表的な実施態様において、BRAF活性は、RAF基質のMEK1/2のリン酸化を測定することによって決定され、ここでMEK1/2のリン酸化の減少は、RAF活性の減少を示す。一実施態様において、MEK1/2のリン酸化は、細胞または細胞抽出物中で測定される。代替の実施態様において、MEK1/2のリン酸化は、インビトロの精製または組換えタンパク質を用いたリン酸化分析で測定される。当業界でよく知られているMEK1/2のリン酸化を検出する方法は、BRAFPオリペプチドまたは突然変異型BRAFPオリペプチドの活性の指標としてMEK1/2のリン酸化を測定するのに適している。このような方法としては、これらに限定されないが、ウェスタンブロットおよびマススペクトロスコピーが挙げられる。所定の実施態様において、MEK1/2のリン酸化分析は、インビトロで組換えタンパク質を用いて行うことができる。その他の実施態様において、MEK1/2のリン酸化分析は、インビボで培養細胞または実験動物を用いて行うことができる。

30

## 【0037】

その他の代表的な実施態様において、BRAF活性は、MEK基質のERK1/2のリン酸化を測定することによって決定され、ここでERK1/2のリン酸化の減少は、BRAF活性の減少を示す。一実施態様において、ERK1/2のリン酸化は、細胞または細胞抽出物中で測定される。代替の実施態様において、ERK1/2のリン酸化は、インビトロの精製または組換えタンパク質を用いたリン酸化分析で測定される。当業界でよく知られているERK1/2のリン酸化を検出する方法は、BRAFPオリペプチドまたは突然変異型BRAFPオリペプチドの活性の指標としてERK1/2のリン酸化を測定するのに適している。このような方法としては、これらに限定されないが、ウェスタンブロットおよびマススペクトロスコピーが挙げられる。所定の実施態様において、ERK1/2のリン酸化分析は、インビトロで組換えタンパク質を用いて行うことができる。その他の実施

40

50

態様において、E R K 1 / 2 のリン酸化分析は、インビボで培養細胞または実験動物を用いて行うことができる。

【 0 0 3 8 】

一実施態様において、第二世代のR A F 阻害剤の同定に突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する宿主細胞が用いられ、ここでこのような宿主細胞が試験化合物に対して感受性を有する場合、その試験化合物は、第二世代のR A F 阻害剤として同定される。本明細書で用いられる用語「宿主細胞の試験化合物に対する感受性」は、試験化合物が、例えば細胞増殖、細胞増殖、細胞の生存および/または細胞内シグナル伝達（例えばM E K 1 / 2 などの1種またはそれより多くのB R A F 基質、または、例えばE R K 1 / 2 などの1種またはそれより多くの下流シグナル伝達分子のリン酸化によって証明されるような、B R A F が介在するシグナル伝達）などの1種またはそれより多くのパラメーターで測定可能な作用を有することを意味するものとする。

10

【 0 0 3 9 】

化合物の存在または非存在下における突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する細胞の生存または増殖率を決定することによって、その化合物が第二世代のR A F 阻害剤として同定することが可能である。このような分析で用いられる細胞系が野生型B R A F ポリペプチドを発現する場合、これらの細胞系は、R A F 阻害剤に感受性を有すると予想され、さらに、上記細胞系が突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する場合、R A F 阻害剤（すなわち第一世代のR A F 阻害剤）に対して耐性を有すると予想される。第二世代のR A F 阻害剤の同定に有用な典型的な細胞系は、黒色腫細胞系A 3 7 5 である。A 3 7 5 細胞は、野生型B R A F ポリペプチドを発現する場合、R A F 阻害剤のR A F - 2 6 5 に感受性を有するが、A 3 7 5 細胞は、突然変異型B R A F ポリペプチド、例えば以下に示す1種またはそれより多くの耐性突然変異：A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 F を含むB R A F ポリペプチドを発現する場合、R A F - 2 6 5 に対して耐性を有する。

20

【 0 0 4 0 】

第二世代のR A F 阻害剤である化合物の存在下において、突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する細胞系は、このような化合物が存在しない場合よりも低い生存または増殖率を有する。第二世代のR A F 阻害剤ではない化合物の存在下において、突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する細胞系は、化合物が存在しない場合と等価体かまたはそれよりも高い生存または増殖率を有する。B R A F ポリペプチドまたは突然変異型B R A F ポリペプチドを発現する細胞系の試験化合物に対する感受性を決定するために、当業界でよく知られている細胞の生存および/または増殖率の測定方法が適している。このような方法としては、これらに限定されないが、トリパンブルー色素排除、テトラゾリウム化合物の代謝、トリチウム化チミジンの取り込み、B r d U 取り込み、グルコース摂取、A T P 濃度、および、アポトーシスレベルの測定が挙げられる。一実施態様において、細胞増殖は、例えばM T S またはセルタイターG L o などのウェルベースの細胞増殖/生存分析を用いて決定することができる。所定の実施態様において、感受性は、G I 5 0 値における、適切なコントロールと比較して少なくとも2倍、より好ましくは少なくとも3倍、最も好ましくは少なくとも4 ~ 5 倍のシフトと定義される。

30

40

【 0 0 4 1 】

従って、一実施態様において、本発明は、第二世代のR A F 阻害剤である化合物の同定方法を提供し、本方法は、B R A F 基質と、野生型B R A F ポリペプチドに比べて（またはB R A F V 6 0 0 E ポリペプチドに比べて）1またはそれより多くの突然変異を有するB R A F ポリペプチドとを含む分析組成物を提供すること、試験化合物の非存在下でB R A F 基質のリン酸化を可能にする条件下で、分析組成物を試験化合物と接触させること、および、B R A F 基質のリン酸化に対する試験化合物の作用を決定すること、を含み、

50

ここで適切なコントロールと比較してB R A F基質のリン酸化がダウンレギュレーションされている場合、その化合物は第二世代のR A F阻害剤として同定される。この方法で同定された化合物は、例えば突然変異型R A Fポリペプチドが検出された癌のような癌を治療するのに有用な化合物である。前述の方法において有用なB R A Fポリペプチドは、R A F阻害剤のR A F - 2 6 5に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異を含むB R A Fポリペプチドであり、例えば、1種またはそれより多くの本明細書において説明された突然変異を含むB R A Fポリペプチドである。前述の方法において有用なB R A F基質は、例えばM E K 1 / 2である。M E K 1 / 2のリン酸化の低下、減少またはダウンレギュレーションは、その化合物がR A F阻害剤であることを示す指標である。同様に、前述の方法において有用な下流のR A Fシグナル伝達分子は、例えばE R K 1 / 2である。E R K 1 / 2リン酸化の低下、減少またはダウンレギュレーションは、その化合物がR A F阻害剤であることを示す指標である。前述の方法はインビトロで行うこともでき、ここでB R A FポリペプチドおよびB R A F基質は、単離タンパク質または精製タンパク質である。また前述の方法は、インビトロで行ってもよく、ここでB R A FポリペプチドおよびB R A F基質は、細胞抽出物の構成要素である。この実施態様において、分析組成物は、細胞抽出物である。適切なコントロールは、当業者にとって上記方法を行う際によく用いられると予想されるあらゆるコントロールであり、このようなコントロールとしては、例えば、試験化合物で処理していない、または、コントロール化合物で処理した類似または同一の分析組成物、または、「野生型」B R A FポリペプチドまたはB R A F V 6 0 0 Eポリペプチドを含む類似の分析組成物または細胞抽出物が挙げられる。

10

20

#### 【0042】

その他の実施態様において、本発明は、第二世代のR A F阻害剤である化合物の同定方法を提供し、本方法は、突然変異型B R A Fポリペプチドを含む細胞を提供すること、該細胞を試験化合物と接触させること、および、M E K 1 / 2のリン酸化、E R K 1 / 2リン酸化または細胞増殖に対する試験化合物の作用を決定すること、を含み、ここで適切なコントロールと比べて、M E K 1 / 2のリン酸化、E R K 1 / 2リン酸化または細胞増殖が低下、減少またはダウンレギュレーションされた場合、その化合物は第二世代のR A F阻害剤として同定される。この方法で同定された化合物は、例えば突然変異型B R A Fポリペプチドが検出された癌のような癌を治療するのに有用な化合物である。適切なコントロールは、当業者にとって本方法を行う際によく用いられると予想されるあらゆるコントロールであり、このようなコントロールとしては、例えば、試験化合物で処理していない、または、コントロール化合物で処理した類似または同一な細胞、または、組換え、「野生型」B R A FまたはB R A F V 6 0 0 Eを発現させた類似の細胞または細胞抽出物が挙げられる。

30

#### 【0043】

一実施態様において、前述の方法で用いられる試験化合物は、野生型R A Fポリペプチド、例えばB R A Fポリペプチドの生物活性を阻害するR A F阻害剤である。それに加えて、または、その代わりに、前述の方法で用いられる試験化合物は、B R A F V 6 0 0 Eポリペプチドの活性を阻害するR A F阻害剤である。一実施態様において、第二世代のR A F阻害剤であるかどうかを決定するための試験化合物として用いられる可能性があるR A F阻害剤としては、P L X 4 0 3 2、P L X 5 5 6 8、X L 2 8 1、および、U S 2 0 0 8 / 0 1 0 8 6 1 5（この内容は参照により本明細書に組み入れられる）で説明されているイミダゾール - 2 - カルボキサミド誘導体が挙げられる。

40

#### 【0044】

その他の実施態様において、試験化合物は、試験化合物ライブラリーの種類である。「試験化合物ライブラリー」は、多種多様な試験化合物を含むパネルを意味する。有機小分子の分子ライブラリーを合成するアプローチは、説明されている (Carell et al. (1994) . Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061)。本発明の化合物は、当業界でよく知られているコンビナトリアルライブラリー法における様々なアプローチのいずれかを用いて得ることができ、このようなア

50

アプローチとしては、生物学的ライブラリー；三次元的に処理可能なパラレルな固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「1 ピーズに対して1化合物」のライブラリー法、および、アフィニティークロマトグラフィーによる選択を利用した合成ライブラリー法が挙げられる。生物学的ライブラリーのアプローチはペプチドライブラリーに限定されるが、それ以外の4種のアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは低分子物質の化合物ライブラリーに適用することができる(Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。その他の典型的な分子ライブラリーの合成方法は当業界でよく知られており、例えば：Erb et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Horwell et al. (1996) *Immunopharmacology* 33:68- ;および、Gallop et al. (1994); *J. Med. Chem.* 37:1233-で見出すことができる。化合物ライブラリーは、溶液中（例えば、Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421）、または、ビーズ上（Lam (1991) *Nature* 354:82-84）、チップ上（Fodor (1993) *Nature* 364:555-556）、細菌（Ladnerの米国特許第5,223,409号）、胞子（Ladnerの米国特許第5,223,409号）、プラスミド（Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869）、または、ファージ（Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390）; (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310)に提供されてもよい。さらにその他の実施態様において、コンビナトリアルポリペプチドは、cDNAライブラリーから生産される。活性でスクリーニングすることができる典型的な化合物としては、これらに限定されないが、ペプチド、核酸、炭水化物、有機小分子および天然産物抽出物ライブラリーが挙げられる。

#### 【0045】

第二世代のRAF阻害剤は、本明細書において説明される1またはそれより多くの耐性突然変異を含むBRAF対立遺伝子の構造に基づいて合理的に設計することもできる。本明細書において説明されているように、RAF阻害剤に対する耐性を付与するBRAFの残基は、第一世代のRAF阻害剤のRAF-265と結合するBRAFの同じ領域に位置する。RAF阻害剤に対する耐性を付与するBRAF突然変異体の対立遺伝子を同定することによって、突然変異体の対立遺伝子の構造と野生型BRAFまたはBRAFV600Eとの比較が可能になる。第一世代のRAF阻害剤に対する耐性を付与する変更された構造的特徴を知ることにより、突然変異体の対立遺伝子と結合しそれを阻害する阻害剤などのリガンドの合理的な設計および構築が可能になる。このような阻害剤は、本明細書において説明される第二の突然変異を含まないBRAF突然変異体の対立遺伝子、BRAFV600Eと野生型BRAFとの両方に結合するように設計することができる。本明細書において説明される1またはそれより多くの突然変異を含むBRAF対立遺伝子と結合するように設計された阻害剤は、第二世代のRAF阻害剤である。このような合理的に設計された阻害剤の突然変異型BRAFポリペプチドの生物活性を阻害する能力は、本明細書において説明されるインビトロおよび/またはインビボの分析を用いて確認することができる。

#### 【0046】

本明細書において説明される1またはそれより多くの耐性突然変異を含むBRAFポリペプチドの構造は、コンピューター支援のモデリングによって、または、突然変異型BRAFポリペプチドの結晶または溶液構造を決定することによって決定することができる。突然変異型BRAFポリペプチドの構造を決定するために、当業界でよく知られている適切なあらゆる方法を使用することができる。

#### 【0047】

典型的なコンピューター支援のモデリング方法としては、例えばPymol、Cavity (J. Comp. Aided. Mol. Des. (1990) 4:337-354で説明されている（参照により本明細書に組み入れられる）、および、Discovery StudioR（アクセルリス(Accelrys)、カリフォルニア州サンディエゴ)などのソフトウェアプログラムの使用が挙げられる。コンピューター支援の分子モデリングに有用な追加の技術は、J BUON. (2007) 12 Suppl 1:S101-18（参

10

20

30

40

50

照により本明細書に組み入れられる)で説明されている。また上記タンパク質に結合すると予想される分子を同定するのに、既知の構造を有するタンパク質のコンピューターに基づく解析も使用することができる。このような方法は、分子の受容体部位に相補的な形状に基づいて分子を分類する。例えばDOCKのようなプログラムは、三次元データベースを用いて、XBP-1、IRE-1アルファおよび/またはEDMに結合すると予想される分子を同定するのに利用することができる。DesJarlias et al. (1988) J. Med. Chem. 31:722; Meng et al. (1992) J. Computer Chem. 13:505; Meng et al. (1993) Proteins 17:266; Shoichet et al. (1993) Science 259:1445を参照。加えて、標的タンパク質に対する分子の電子的な相補性を解析して、標的に結合する分子を同定することもできる。これは、例えば、Meng et al. (1992) J. Computer Chem. 13:505、および、Meng et al. (1993) Proteins 17:266で説明されているような分子力学力場を用いて決定することができる。使用できるその他のプログラムとしては、推定上のリガンドとのドッキングでGRID力場を利用するCLIX(例えば、Lawrence et al. (1992) Proteins 12:31; Goodford et al. (1985) J. Med. Chem. 28:849;および、Boobbyer et al. (1989) J. Med. Chem. 32:1083を参照、これら全体が開示に組み入れられる)が挙げられる。

#### 【0048】

結晶化は、あらゆる結晶化方法によって行うことができ、このような方法としては、これらに限定されないが、バッチ法、透析法および蒸気拡散法(例えば、シッティングドロップおよびハンギングドロップ)法が挙げられる。また結晶化を容易にするために、結晶のマイクロ、マクロおよび/またはストリークシーディングを行うこともある。BRAF突然変異体の対立遺伝子を含む結晶は、当業界でよく知られている様々な方法によって形成することができる。例えば結晶化は、バッチ法、透析法および蒸気拡散法(シッティングドロップおよびハンギングドロップ)法によって行うことができる。基本的なタンパク質結晶化のセットアップの詳細な説明は、McRee, D., Practical Protein Crystallography, 第2版(1999), アカデミックプレス社(Academic Press Inc.)を参照してもよい。結晶化実験を行うことに関するさらなる説明は、Stevens et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol.: 10(5):558-63ならびに米国特許第6,296,673号;5,419,278号;および、5,096,676号(これらの内容は参照により本明細書に組み入れられる)で示されている。このような結晶は、BRAF突然変異体の対立遺伝子の三次元構造を決定するために、X線または中性子回折解析を行うのに利用することができる。BRAFポリペプチドまたは突然変異型BRAFポリペプチドの溶液構造は、当業界でよく知られている技術を利用した核磁気共鳴分光分析を用いて同定することができる。X線結晶学またはNMR分光分析によるポリペプチド構造決定に適した方法は、Brunger et al., (1998) "Crystallography & NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination", Acta Crystallogr D54, 905-921; Brunger et al. (1987) "Solution of a Protein Crystal Structure With a Model Obtained From NMR Interproton Distance Restraints", Science 235, 1049-1053; Drenth, "Principles of Protein X-ray Crystallography", (1994), Springer-Verlag. pp. 1-19; and Narula et al. (1995) "Solution structure of the C-terminal SH2 domain of the human tyrosine kinase Syk complexed with a phosphotyrosine pentapeptide", Structure 3, 1061-1073で説明されており、これらの全体は参照により本明細書に組み入れられる。突然変異型RAFポリペプチドの結晶または溶液構造が同定されたら、上述のコンピューター支援のモデリングアプローチを利用して突然変異型BRAFポリペプチドの阻害剤を同定することができる。

#### 【0049】

前述の方法によって同定された第二世代のRAF阻害剤は、野生型および/または突然変異型RAFポリペプチドの発現に伴う病気または状態を治療するのに有用である。例えば、第二世代のRAF阻害剤は、被験者における癌を治療するのに有用であり、具体的には、突然変異型BRAFポリペプチドが同定されている癌を治療するのに有用である。代表的な実施態様において、第二世代のRAF阻害剤は、以下のアミノ酸残基の1種または

10

20

30

40

50

それより多く：A 2 9、H 7 2、S 1 1 3、S 1 2 4、P 1 6 2、C 1 9 4、L 2 2 7、P 2 3 1、C 2 5 1、V 2 9 1、Q 3 2 9、K 4 8 3、L 4 8 5、T 5 2 1、V 5 2 8、D 5 8 7、P 6 5 5、S 6 5 7、S 6 8 3、P 6 8 6、C 6 9 6、L 6 9 7、P 7 2 2、F 7 3 8、および、C 7 4 8に突然変異を有するB R A Fポリペプチドを含む癌を治療するのに有用である。関連する実施態様において、第二世代のR A F阻害剤は、以下に示す突然変異の1種またはそれより多く：A 2 9 V、H 7 2 N、S 1 1 3 I、S 1 2 4 F、P 1 6 2 H、C 1 9 4 \*、L 2 2 7 F、P 2 3 1 T、C 2 5 1 F、V 2 9 1 F、Q 3 2 9 K、K 4 8 3 E、L 4 8 5 F、T 5 2 1 K、V 5 2 8 F、D 5 8 7 E、P 6 5 5 T、S 6 5 7 \*、S 6 8 3 R、P 6 8 6 Q、P 6 8 6 T、C 6 9 6 \*、L 6 9 7 I、P 7 2 2 T、F 7 3 8 L、および、C 7 4 8 Fを有するB R A Fポリペプチドを含む癌を治療するのに有用である。

10

## 【0050】

## I V . 単離された核酸分子

本発明は、B R A F 遺伝子関連のポリヌクレオチドまたは核酸分子およびそれぞれの遺伝子産物に関する。これらのポリヌクレオチドまたは核酸分子は哺乳動物細胞から単離して精製することができる。本発明の具体的な形態において、本明細書において説明される単離したB R A F 核酸分子は、B R A F 阻害剤に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異を含む。「突然変異型B R A F 核酸分子」は、本明細書において述べられるように、突然変異型B R A F ポリペプチドをコードする、すなわち1またはそれより多くの既知のB R A F 阻害剤に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異を含むB R A F ポリペプチドをコードするB R A F 核酸分子を含む。

20

## 【0051】

単離して精製したB R A F 核酸分子、例えば突然変異型B R A F 核酸分子が、R N A またはD N A のどちらの形態でもあり得ることも考えられる。本明細書で用いられる用語「R N A 転写物」は、D N A 核酸分子からの転写産物であるR N A 分子を意味する。このような転写物は、1種またはそれより多くのポリペプチドをコードしていてもよい。

## 【0052】

本願において用いられるように、用語「ポリヌクレオチド」は、単離された核酸分子、R N A またはD N A を意味し、例えば全体のゲノム核酸を含まない状態の核酸分子、R N A またはD N A である。それゆえに「B R A F をコードするポリヌクレオチド」は、B R A F のコード配列を含むが、全体のゲノムD N A およびタンパク質から単離されているか、または、精製してそれらを含まない状態である核酸セグメントを意味する。本願においてB R A F をコードするポリヌクレオチドまたは核酸の機能または活性について述べられる場合、それは、そのようなポリヌクレオチドは、野生型B R A F ポリペプチドの活性（例えばM E K 1 またはM E K 2 基質のリン酸化）を達成することができる分子をコードすることを意味する。

30

## 【0053】

用語「c D N A」は、テンプレートとしてR N A を用いて製造されたD N A を意味することとする。c D N A を用いる利点は、ゲノムD N A またはR N A 転写物とは対照的に、安定性があることと、組換えD N A 技術を用いて配列を操作する能力である（Sambrook, 1989; Ausubel, 1996を参照）。完全なゲノム配列が好ましい場合もあるし、または部分的なゲノム配列が好ましい場合もある。あるいは、c D N A はポリペプチドのコード領域を示し、イントロンなどの調節領域が除去されているため、c D N A が有利である可能性がある。

40

## 【0054】

また、所定の細胞由来の所定のB R A F をコードする核酸またはB R A F 遺伝子が、わずかに異なる核酸配列を有するが、それでも活性なB R A F ポリペプチドをコードする天然の変異体または変異株によって示され得ることも考えられる。好ましい実施態様において、活性なB R A F ポリペプチドは、活性なヒトB R A F ポリペプチドである。特に好ましい実施態様において、活性なB R A F ポリペプチドは、野生型B R A F ポリペプチドの

50

活性を有するが、1種またはそれより多くの既知のBRA F阻害剤に対して耐性を有する突然変異型BRA Fポリペプチドである。その結果として、本発明の所定の形態は、アミノ酸変化が最小であるが、同じ生物学的機能を有するBRA F誘導体を包含する。

【0055】

用語「遺伝子」は、機能性タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする単位を意味するものとして簡略的に用いられる。当業者であれば理解しているものと思われるが、この機能的な用語は、タンパク質、ポリペプチド、ドメイン、融合タンパク質および突然変異タンパク質を発現する、または、それらが発現されるように適応させることができるゲノム配列、cDNA配列、および、比較的小さい加工された遺伝子セグメントを含む。BRA Fをコードする核酸分子は：少なくとも約6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5100、5200、5300、5400、5500、5600、5700、5800、5900、6000、6100、6200、6300、6400、6500、6600、6700、6800、6900、7000、7100、7200、7300、7400、7500、7600、7700、7800、7900、8000、8100、8200、8300、8400、8500、8600、8700、8800、8900、9000、9100、9200、9300、9400、9500、9600、9700、9800、9900、10000、10100、10200、10300、10400、10500、10600、10700、10800、10900、11000、11100、11200、11300、11400、11500、11600、11700、11800、11900、12000個またはそれより多くの長さのヌクレオチド、ヌクレオシドまたは塩基対を有する連続した核酸配列を含んでいてもよい。このような配列は、例えば配列番号1またはそれらのフラグメントと同一であってもよいし、またはそれらに相補的であってもよい。

10

20

30

【0056】

様々な本発明の実施態様は、BRA Fにおける遺伝学的な突然変異に関する。本明細書で用いられるように、突然変異は、BRA F核酸分子の部位における単一のヌクレオチドの付加、欠失または置換を意味する。代表的な実施態様において、突然変異型BRA F核酸分子は、特定の治療に対する耐性、例えばRAF - 265のようなBRA F阻害剤に対する耐性を付与する1またはそれより多くの突然変異を含む。関連する実施態様において、突然変異型BRA Fの核酸分子は、突然変異型BRA F核酸分子が突然変異型BRA Fポリペプチドをコードするような1またはそれより多くの突然変異を含み、ここで突然変異型BRA Fポリペプチドは、特定の治療に対する耐性、例えばRAF - 265のようなBRA F阻害剤に対する耐性を付与する1またはそれより多くの突然変異を含む。従って、本発明の具体的な形態において、配列を変更させることによって、その配列によってコードされたポリペプチドの特性に、結果的に治療に対する少なくともある程度の耐性、例

40

50

えばBRAF阻害剤での治療に対する耐性が起るような影響を与える変化が生じる。

【0057】

「実質的にその他のコード配列から単離された」とは、対象の遺伝子が核酸セグメントのコード領域の一部を形成しており、そのセグメントは、天然に存在するコード核酸の大部分、例えば大きい染色体フラグメント、または、その他の機能的な遺伝子またはcDNAコード領域を含まないことを意味する。当然ながら、これは、もともと単離されており、人為的操作によってセグメントに付加された遺伝子またはコード領域を後で排除しない核酸セグメントを意味する。

【0058】

具体的な実施態様において、本発明は、そのアミノ酸配列内に、突然変異型BRAFポリペプチドに従って、または、実質的に突然変異型BRAFポリペプチドに対応する連続したアミノ酸配列を含む、突然変異型BRAFポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列が組み込まれた、単離された核酸セグメントおよび組換えベクターに関する。代表的な実施態様において、本発明は、そのアミノ酸配列内に、BRAF阻害剤に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異を含むBRAFポリペプチドの連続したアミノ酸配列を含む、BRAFタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードするDNA配列が組み込まれた単離したDNAセグメントおよび組換えベクターに関する。所定の実施態様において、上記1またはそれより多くの突然変異は、A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748の位置で起こる。その他の実施態様において、上記1またはそれより多くの突然変異は、A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fを含む。

【0059】

本発明で用いられる核酸セグメントは、コード配列それ自身の長さに関係なく、その他のDNAまたはRNA配列、例えばプロモーター、ポリアデニル化シグナル、追加の制限酵素部位、複数のクローニング部位、その他のコーディングセグメントなどと組み合わせることができ、その結果、それら全体の長さが著しく変化してもよい。従って、ほぼあらゆる長さの核酸フラグメントを使用することも考えられるが、全体の長さは、目的とする組換えDNAプロトコールにおける調製および使用が容易になるように制限することが好ましい。

【0060】

本発明の核酸コンストラクトが、BRAFポリペプチドまたは突然変異型BRAFポリペプチドをコードすることが考えられる。「異種」配列は、その他の配列にとって外来または外因性である配列を意味する。異種遺伝子は、その遺伝子とその時点で一緒に配置されている配列の近辺で天然状態では見出されない遺伝子を意味する。

【0061】

非限定的な実施例において、BRAF遺伝子の全部または一部と同一な、または、それらに相補的な連続したヌクレオチドのストレッチを含む1種またはそれより多くの核酸コンストラクトを製造することができる。核酸コンストラクトは、長さが少なくとも50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、11,000、12,000、13,000、14,000、15,000、20,000、30,000、50,000、100,000、250,000、約500,000、750,000~約1,000,000個のヌクレオチドを含んでいてもよいし、加えて、酵母人工染色体のような核酸コンストラクトの出現が当業者によく知られていることを考慮すると、それより

10

20

30

40

50

も大きいサイズのコンストラクト、例えば最大染色体サイズのヌクレオチドを含んでいてもよい（その間のあらゆる中間の長さおよび中間の範囲を含む）。当然のことながら、本明細書で用いられる「中間の長さ」および「中間の範囲」は、引用された値を含む、または、それらの値の間のあらゆる長さまたは範囲を意味する（すなわち、このような値を含む、および、それらの間の全ての整数）。中間の長さの非限定的な例としては、約 11、約 12、約 13、約 16、約 17、約 18、約 19 など；約 21、約 22、約 23 など；約 31、約 32 など；約 51、約 52、約 53 など；約 101、約 102、約 103 など；約 151、約 152、約 153、約 97001、約 1,001、約 1002、約 50,001、約 50,002、約 750,001、約 750,002、約 1,000,001、約 1,000,002 などが挙げられる。中間の範囲の非限定的な例としては、約 3 ~ 約 32、約 150 ~ 約 500,001、約 3,032 ~ 約 7,145、約 5,000 ~ 約 15,000、約 20,007 ~ 約 1,000,003 などが挙げられる。

#### 【0062】

本発明の所定の実施態様は、ベクター、プロモーター、治療的な核酸、および、細胞中の形質転換および発現に關与するその他の核酸要素などの様々な核酸に関する。所定の形態において、核酸は、野生型核酸、または、突然変異体核酸を含む。具体的な形態において、核酸は、転写された核酸をコードするか、または、転写された核酸を含む。

#### 【0063】

用語「核酸」は当業界でよく知られている。「核酸」は、本明細書で用いられるように、一般的に、DNA、RNA またはそれらの核酸塩基を含む誘導體もしくは類似体の分子（すなわち鎖）を意味することとする。核酸塩基としては、例えば、DNA 中に見出される天然に存在するプリンまたはピリミジン塩基（例えばアデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」またはシトシン「C」）、または、RNA 中に見出される天然に存在するプリンまたはピリミジン塩基（例えば、A、G、ウラシル「U」または C）が挙げられる。用語「核酸」は用語「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」を包含し、これらはそれぞれ用語「核酸」の下位分類である。用語「オリゴヌクレオチド」は、核酸塩基の長さが約 3 ~ 約 100 の分子を意味する。用語「ポリヌクレオチド」は、核酸塩基の長さが約 100 よりも大きい少なくとも 1 つの分子を意味する。「遺伝子」は、遺伝子産物のコード配列を意味し、加えてイントロンおよび遺伝子産物のプロモーターのコード配列も意味する。特許請求された発明の組成物および方法とともに使用するための核酸として、BRAF 遺伝子に加えてその他の調節領域、例えば BRAF のエンハンサーも考慮される。

#### 【0064】

これらの定義は、一般的には一本鎖分子を意味するが、具体的な実施態様においては、一本鎖分子に部分的に、実質的に、または完全に相補的な追加の鎖も含まれることもある。従って、核酸は、1 またはそれより多くの相補鎖または特定の配列を含む分子の「相補物」を含む、二本鎖分子または三本鎖分子を包含する可能性もある。本明細書で用いられるように、一本鎖核酸は接頭辞「ss」で、二本鎖核酸は接頭辞「ds」で、および、三本鎖核酸は接頭辞「tss」で表示することができる。

#### 【0065】

核酸は、当業者によく知られているあらゆる技術によって作製することができる、例えば、化学合成、または、酵素的な生産、または、生物学的な生産によって作製することができる。合成核酸（例えば、BRAF 阻害剤に対する耐性を付与する突然変異の同定を容易にする合成 BRAF プライマー）の非限定的な例としては、インビトロでのホスホトリエステルを用いた化学合成、亜リン酸またはホスホアミダイト化学および固相技術、例えば、EP266,032（参照により本明細書に組み入れられる）で説明されているような技術、または、Froehler et al., 1986 および米国特許第 5,705,629 号（それぞれ参照により本明細書に組み入れられる）で説明されているようなデオキシヌクレオシド H-ホスホン酸中間体を介した技術によって製造された核酸が挙げられる。本発明の方法において、1 種またはそれより多くのオリゴヌクレオチドを用いてもよい。オリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチド合成の多種多様なメカニズムが、例えば米国特許第4,659,774号、4,816,571号、5,141,813号、5,264,566号、4,959,463号、5,428,148号、5,554,744号、5,574,146号、5,602,244号で開示されている（これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる）。

#### 【0066】

酵素的に生産された核酸の非限定的な例としては、PCRのような増幅反応で酵素によって生産された核酸（例えば、米国特許第4,683,202号および4,682,195号を参照、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる）、または、米国特許第5,645,897号（参照により本明細書に組み入れられる）で説明されているようにしてオリゴヌクレオチドの合成によって生産された核酸が挙げられる。生物学的に生産された核酸の非限定的な例としては、生きた細胞中で生産された（すなわち複製された）組換え核酸、例えば細菌中で複製された組換えDNAベクター（例えば、Sambrook et al. 1989を参照、参照により本明細書に組み入れられる）が挙げられる。

10

#### 【0067】

核酸は、BRAFに対する耐性を付与する突然変異の評価の一環として、ポリアクリルアミドゲル、塩化セシウム勾配遠心法、または、当業者によく知られているその他のあらゆる手段によって精製することができる（例えばSambrook et al., 1989を参照、参照により本明細書に組み入れられる）。好ましい形態において、核酸は、薬理的に許容できる核酸である。薬理的に許容できる組成物は当業者によく知られており、本明細書において説明されているものである。

20

#### 【0068】

所定の形態において、本発明は、単離された核酸としての核酸に関する。本明細書で用いられる用語「単離された核酸」は、1またはそれより多くの細胞のゲノムの核酸全体および転写された核酸のほとんどが含まれないように単離された、または、それ以外の方法でそれらのほとんどが含まれていない状態の核酸分子（例えばRNAまたはDNA分子）を意味する。所定の実施態様において、「単離された核酸」は、細胞成分またはインビトロでの反応構成要素（例えば脂質またはタンパク質などの高分子、低分子量の生体分子など）のほとんどが含まれないように単離された、または、それ以外の方法でそれらのほとんどが含まれていない状態の核酸を意味する。

30

#### 【0069】

##### V. 発現ベクターおよび宿主細胞

本発明は、発現ベクター組成物、および、BRAFポリペプチド、例えば突然変異型BRAFポリペプチドをコードさせるためのこのようなベクターの使用を包含し、加えてこのような発現ベクターが導入された宿主細胞組成物を包含する。用語「ベクター」は、核酸配列を複製することができる細胞に導入するために、核酸配列を挿入することができるキャリアー核酸分子を意味するものとして用いられる。核酸配列は「外因性」であってもよく、ここで外因性とは、その配列が、ベクターを導入しようとする細胞にとって外来のものであること、または、その配列が、細胞中の配列に相同であるが、その配列が通常見出されない宿主細胞内の核酸の位置に存在することを意味する。ベクターとしては、プラスミド、コスミド、ウイルス（バクテリオファージ、動物ウイルスおよび植物ウイルス）、ならびに人工染色体（例えばYAC）が挙げられる。当業者であれば標準的な組換え技術によってベクターを構築することについて十分に認識しているものと思われ、このような技術は、Sambrook et al., 1989 and Ausubel et al., 1996（いずれも参照により本明細書に組み入れられる）で説明される。

40

#### 【0070】

用語「発現ベクター」または「発現コンストラクト」は、転写させることができる遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含むベクターを意味する。場合によっては、それに続いてRNA分子はタンパク質、ポリペプチド、または、ペプチドに翻訳される。その他のケースにおいて、これらの配列は、例えばアンチセンス分子またはリボザイ

50

ム生産において翻訳されない。発現ベクターは様々な「制御配列」を含んでいてもよく、ここで制御配列とは、特定の宿主生物中で作動可能なように連結したコード配列の転写および場合によっては翻訳に必要な核酸配列を意味する。転写および翻訳を支配する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、同様にその他の機能を果たす核酸配列を含んでいてもよい（このような核酸配列については以下で説明する）。

【0071】

#### 1. プロモーターおよびエンハンサー

「プロモーター」は、コントロール配列であって、これは、転写開始および速度を制御する核酸配列の領域である。これらは、調節タンパク質および分子が例えばRNAポリメラーゼやその他の転写因子と結合することができる遺伝学的要素を含んでいてもよい。「作動可能なように位置する」、「作動可能に結合した」、「制御下で」および「転写制御下で」という成句は、プロモーターが、転写開始および/またはその配列の発現を制御するための核酸配列に関して適切な機能的な位置および/または方向にあることを意味する。プロモーターは、「エンハンサー」と共に用いられる場合もあるし、そうでない場合もあり、ここで「エンハンサー」は、核酸配列の転写活性化に関するシス作用性の調節配列を意味する。

10

【0072】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/またはエキソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することにより得ることができる遺伝子または配列に通常伴って存在し得るものである。このようなプロモーターは、「内因性」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーは、上記配列の下流または上流のいずれかに位置する核酸配列に通常伴って存在し得るものである。あるいは、組換えまたは異種プロモーター（これは、その自然の環境において通常核酸配列に結合していないプロモーターを意味する）の制御下で、コーディング核酸セグメントの位置決めをすることによってもある種の利点が見られると予想される。また組換えまたは異種エンハンサーも、その自然の環境において通常核酸配列に結合していないエンハンサーのことである。このようなプロモーターまたはエンハンサーとしては、その他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、および、その他のあらゆる原核、ウイルスまたは真核細胞から単離したプロモーターまたはエンハンサー、および、「天然に存在」しないプロモーターまたはエンハンサー、すなわち、異なる転写調節因子領域の異なる要素、および/または、発現を変化させる突然変異を含むプロモーターまたはエンハンサーが挙げられる。

20

30

【0073】

当然に、発現のために選択された細胞型、細胞器官および生物中で効果的に核酸セグメントの発現を指示するプロモーターおよび/またはエンハンサーを用いることが重要であると予想される。分子生物学の当業者であれば一般的に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞型の組み合わせの使用について熟知している（例えばSambrook et al. (1989)を参照、参照により本明細書に組み入れられる）。導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指示するのに適切な条件下で、構成的、組織特異的、誘導性および/または有用なプロモーターを用いることができる。このようなプロモーターは異種プロモーターであってもよいし、または外因性プロモーターであってもよく、例えばBRA Fをコードする配列にとって非BRA Fプロモーターであってもよい。いくつかの例において、インピトロでの望ましい配列の転写で利用するための原核性のプロモーターが用いられる。多くの市販の系で利用できる原核性のプロモーターとしては、T7、T3、および、Sp6が挙げられる。

40

【0074】

#### 2. 開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特異的な開始シグナルも、コード配列の効率的な翻訳に必要な場合がある。これらのシグナルは、ATG開始コドンまたは隣接する配列を含む。ATG開始コドンなどの外因性の翻訳制御シグナルを提供する必要がある場合がある。当業者であれば容易にこのことを決定して必要なシグナルを提供することができるであろう。挿入物全体が確実に翻訳さ

50

れるように、望ましいコード配列のリーディングフレームと共に開始コドンは「フレーム内に」存在させなければならぬことはよく知られている。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものであってもよいし、または合成であってよい。適切な転写エンハンサー要素を包含させることによって発現効率が強化される場合がある。本発明の所定の実施態様において、内部リボソーム侵入部位 (IRES) 要素の使用は、多重遺伝子または多シストロン性のメッセージを創り出すのに利用することができる。

【0075】

### 3. マルチクローニングサイト

ベクターは、マルチクローニングサイト (MCS) を含んでいてもよく、ここでマルチクローニングサイトとは、複数の制限酵素部位を含む核酸領域であり、そのうちのいずれかが、ベクターを消化するための標準的な組換え技術と共に用いることができる (例えば、Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997を参照、参照により本明細書に組み入れられる)。「制限酵素による消化」は、核酸分子中の特異的な位置でのみ機能する酵素を用いた核酸分子の触媒作用による切断を意味する。これらの制限酵素の多くは市販されている。このような酵素の使用は、当業者によって広く理解されている。MCS内で切断を行う制限酵素を用いてベクターを直線状にするかまたは断片化することにより、外来配列をベクターにライゲーションさせるようにすることがよく行われる。「ライゲーション」は、2つの核酸フラグメント間にホスホジエステル結合を形成するプロセスを意味し、これらのフラグメントは、互いに連結していてもよいし、そうでなくてもよい。制限酵素およびライゲーション反応を含む技術は、組換え技術分野の当業者にはよく知られている。

【0076】

### 4. スプライシング部位

ほとんどの転写された真核RNA分子は、一次転写物からイントロンを除去するためにRNAスプライシングを受けると予想される。真核性のゲノム配列を含むベクターは、タンパク質発現のために転写物を適切にプロセシングするために、ドナーおよび/またはアクセプタースプライシング部位を必要とする場合がある (例えば、Chandler et al., 1997を参照、参照により本明細書に組み入れられる)。

【0077】

### 5. 終結シグナル

本発明のベクターまたはコンストラクトは、一般的に少なくとも1つの終結シグナルを含むと予想される。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、RNAポリメラーゼによるRNA転写を特定のところで終結させることに関するDNA配列で構成される。従って、所定の実施態様において、RNA転写物の生産を終わらせる終結シグナルが考慮される。ターミネーターは、インピボにおいて、望ましいメッセージレベルを達成するのに必要なことがある。

【0078】

### 6. ポリアデニル化シグナル

発現のために、特に真核性の発現のために、典型的には、転写物の適切なポリアデニル化を実行するためのポリアデニル化シグナルを含むと予想される。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の実施の成功にとって重要なものではないと考えられており、および/または、このような配列ならばどれでも使用できる。好ましい実施態様としては、便利であり、および/または、様々な標的細胞で十分に機能することがわかっている、SV40ポリアデニル化シグナル、および/または、ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが挙げられる。ポリアデニル化は転写の安定性を高めることができるか、または、細胞質内輸送を容易にする可能性がある。

【0079】

### 7. 複製起点

宿主細胞中のベクターを増やすために、1種またはそれより多くの複製起点部位 (「ori」と称されることが多い) を含んでいてもよく、この複製起点は、複製を開始させる

10

20

30

40

50

特異的な核酸配列である。あるいは宿主細胞が酵母である場合、自律複製型配列 ( A R S ) を用いてもよい。

#### 【 0 0 8 0 】

##### 8 . 選択可能な、および、スクリーニング可能なマーカー

本発明の所定の実施態様において、本発明の核酸コンストラクトを含む細胞は、発現ベクター中にマーカーを含ませることによってインビトロでもインビボでも同定することが可能になる。このようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を付与すると思われ、このような変化によって発現ベクターを含む細胞を容易に同定できるようになる。一般的に、選択マーカーとは、選択を可能にする特性を付与するマーカーのことである。陽性選択マーカーは、マーカーの存在によって選択が可能になるようなマーカーであり、一方で陰性選択マーカーは、マーカーの存在が選択を妨害するようなマーカーである。陽性選択マーカーの例は、薬剤耐性マーカーである。

10

#### 【 0 0 8 1 】

通常、薬剤選択マーカーを包含することは形質転換株のクローニングおよび同定に役立つ、有用な選択マーカーとしては、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、D H F R、G P T、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が挙げられる。条件を満たすことによって形質転換株の識別が可能になる表現型を付与するマーカーに加えてその他のタイプのマーカーも考慮され、例えば熱量解析を原理とするG F Pなどのスクリーニング可能なマーカーが挙げられる。あるいは、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ ( t k ) またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ ( C A T ) のようなスクリーニング可能な酵素を利用することもできる。当業者であれば免疫学的なマーカーをどのようにして使用するかを理解しているものと思われ、場合によってはF A C S解析と共に使用することもある。使用されたマーカーが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現されるのであれば、マーカーは重要ではないと考えられる。選択可能なマーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例は、当業者によく知られている。

20

#### 【 0 0 8 2 】

##### 9 . 宿主細胞

本明細書で用いられるように、用語「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」は、同義的に用いることができる。本発明において、B R A Fポリヌクレオチドを含む細胞は、B R A Fポリヌクレオチドが突然変異型でも野生型でも用いられる可能性がある。またこれらの用語はいずれもそれらの後代も含み、ここで後代とは、その後続くすべての世代を意味する。当然のことながら、いずれの後代も、計画的な突然変異または偶発的な突然変異のために同一でない場合もある。異種核酸配列を発現することに関して、「宿主細胞」は原核または真核細胞を意味し、このような細胞としては、ベクターを複製することができる、および/または、ベクターによってコードされた異種遺伝子を発現することができるあらゆる形質転換可能な生物が挙げられる。宿主細胞はベクターの受容者として用いることができ、さらにそのように用いられてきた。宿主細胞は、「トランスフェクション」または「形質転換」されていてもよく、これらは、外来核酸を宿主細胞に移入または導入させるプロセスを意味する。形質転換した細胞は、初代の対象の細胞とその後代を含む。「組換え宿主細胞」は、組換え核酸、すなわちインビトロで操作された核酸、または、そのように操作された核酸の複製コピーである核酸を有する宿主細胞を意味する。

30

40

#### 【 0 0 8 3 】

宿主細胞は、望ましい結果が、ベクターの複製なのか、ベクターによってコードされた核酸配列の一部または全部の発現なのか、または、感染性のウイルス粒子の生産なのかに応じて原核生物から誘導してもよいし、または真核生物から誘導してもよい。宿主細胞として使用するのに様々な細胞系および培養物が利用可能であり、これらはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション ( A T C C ) から得ることができ、A T C Cとは、生きた培養物や遺伝物質のアーカイブとして役立つ組織である。適切な宿主は、当業者によってベクターの主鎖と要求される結果に基づき決定することができる。多くのベクターを複

50

製するために、例えばプラスミドまたはコスミドを原核生物の宿主細胞に導入することができる。ベクター複製および/または発現のための宿主細胞として用いられる細菌細胞としては、DH5<sup>+</sup>、JM109およびKC8が挙げられ、加えて様々な市販の細菌宿主、例えばシュアー(SURE<sup>TM</sup>)、コンピテント細胞、および、ソロパック(Solopack<sup>TM</sup>)ゴールド細胞(ストラタジーン(Strategene).RTM., ラホヤ)も挙げられる。あるいは、ファージウイルス用の宿主細胞として、大腸菌(E. coli) LE392のような細菌細胞を用いてもよい。

【0084】

本発明の好ましい真核宿主細胞は、黒色腫細胞系A375であり、この細胞は、BRAFポリペプチド、例えば本発明の突然変異型BRAFポリペプチドをコードする発現ベクターで形質転換されている。

10

【0085】

#### 10. 発現系

上記で考察された組成物の少なくとも一部または全部を含む多数の発現系が存在する。BRAF核酸配列またはそれらの同源のポリペプチド、タンパク質およびペプチドを生産するために、原核および/または真核細胞ベースの系が本発明と共に用いることができる。このような系の多くは通常市販されている。

【0086】

昆虫細胞/バキュロウイルス系は、例えば米国特許第5,871,986号、4,879,236号(いずれも参照により本明細書に組み入れられる)で説明されているように、異種核酸セグメントの高レベルのタンパク質発現を起こすことができ、このような系は、例えばインビトロジェン(Invitrogen<sup>TM</sup>)からMaxBac<sup>TM</sup>2.0、および、クロンテック(Clontech<sup>TM</sup>)からBacPack<sup>TM</sup>バキュロウイルス発現系という名称で購入することができる。

20

【0087】

発現系のその他の例としては、合成エクジソン誘導性受容体に関するストラタジーンのコンプリート・コントロール(Complete Control<sup>TM</sup>)誘導性哺乳動物発現系、または、そのpET発現系、大腸菌発現系が挙げられる。誘導性発現系のその他の例は、インビトロジェンより入手可能なものがあり、これは、T-Rex<sup>TM</sup>(テトラサイクリンで調節される発現)系、全長CMVプロモーターを利用した誘導性哺乳動物発現系を含む。クロンテック(Clontech<sup>TM</sup>)製のTet-On<sup>TM</sup>およびTet-Off<sup>TM</sup>系は、哺乳動物宿主中での発現をテトラサイクリンまたはその誘導体を用いて調節するのに用いることができる。これらの系の実際の使用は、Gossen et al., 1992およびGossen et al., 1995、ならびに米国特許第5,650,298号で説明されている(これらはいずれも参照により本明細書に組み入れられる)。

30

【0088】

インビトロジェンはまた、ピチア・メタノリカ(Pichia methanolica)発現系と呼ばれる酵母発現系も提供しており、これは、メチロトロフ酵母のピチア・メタノリカにおいて組換えタンパク質が高レベルで生産されるように設計されている。当業者であれば、核酸配列またはその同源のポリペプチド、タンパク質もしくはペプチドを生産するために、ベクター、例えば発現コンストラクトをどのようにして発現させるかについてよく知っているものと思われる。

40

【0089】

#### VI. 単離したポリペプチド分子

本発明のその他の形態は、単離および/または精製したBRAFタンパク質、および、それらの生物学的に活性な部分に関する。本発明の具体的な形態において、本明細書において説明されるBRAFポリペプチドは、BRAF阻害剤に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異を含む。「突然変異型BRAFポリペプチド」は、本明細書において述べられるように、1種またはそれより多くの既知のBRAF阻害剤に対する耐性を付与する、1種またはそれより多くの突然変異を含むBRAFポリペプチドを含む。

【0090】

50

「単離した」または「精製した」タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分は、実質的に、組換えDNA技術によって生産された場合ならば細胞の成分、または、化学合成された場合ならば前駆体化学物質もしくはその他の化学物質を含まない。「実質的に細胞成分を含まない」という文言は、BRAFタンパク質を自然にまたは組換えによって生産する細胞の細胞成分から、BRAFタンパク質が分離されている状態のBRAFタンパク質調製物を含む。一実施態様において、「実質的に細胞成分を含まない」という文言は、(乾燥重量で)約30%未満の非BRAFタンパク質(また、本明細書においては「不純物タンパク質」とも称される)、より好ましくは約20%未満の非BRAFタンパク質、さらにより好ましくは約10%未満の非BRAFタンパク質、最も好ましくは約5%未満の非BRAFタンパク質を含むBRAFタンパク質調製物を含む。BRAFタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分が組換え生産される場合、これらも実質的に培地を含まないことが好ましく、すなわち培地は、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満で存在する。「実質的に前駆体化合物またはその他の化学物質を含まない」という文言は、BRAFタンパク質が、タンパク質合成に關与する前駆体化合物またはその他の化学物質から分離されている状態のBRAFタンパク質調製物を含む。一実施態様において、「実質的に前駆体化合物またはその他の化学物質を含まない」という文言は、(乾燥重量で)約30%未満の前駆体化合物または非BRAF化学物質、より好ましくは約20%未満の前駆体化合物または非BRAF化学物質、さらにより好ましくは約10%未満の前駆体化合物または非BRAF化学物質、最も好ましくは約5%未満の前駆体化合物または非BRAF化学物質を含むBRAFタンパク質調製物を含む。

10

20

## 【0091】

BRAFタンパク質の生物学的に活性な部分は、BRAFタンパク質のアミノ酸配列、例えば配列番号2に示されるアミノ酸配列、または、BRAFタンパク質に相同なタンパク質のアミノ酸配列から誘導されたアミノ酸配列を含むペプチドを含み、ここでこのようなペプチドは、全長BRAFタンパク質またはBRAFタンパク質に相同な全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、さらに、BRAFタンパク質の活性のうち少なくとも1種を示す。典型的には、生物学的に活性な部分(ペプチド、例えば5、10、15、20、30、35、36、37、38、39、40、50、100、200、300、400、500、600、700個またはそれより多いアミノ酸長さを有するペプチド)は、BRAFタンパク質の活性のうち少なくとも1種を有するドメインまたはモチーフを含む。さらに、タンパク質のその他の領域が欠失したその他の生物学的に活性な部分は組換え技術によって製造して、それらを本明細書において説明される活性のうち1種またはそれより多くについて評価することができる。好ましくは、BRAFタンパク質の生物学的に活性な部分は、1またはそれより多くの選択された生物活性を有するドメイン/モチーフまたはそれらの部分を含む。好ましい実施態様において、BRAFタンパク質の生物学的に活性な部分は、野生型BRAF配列と比べて1またはそれより多くの突然変異を含み、ここで前記1またはそれより多くの突然変異は、全長突然変異型BRAFポリペプチド中に存在する場合、既知のBRAF阻害剤に対する耐性を突然変異型BRAFポリペプチドに付与する。代表的な実施態様において、このような突然変異は、以下に示す野生型BRAFタンパク質中の1またはそれより多くの位置：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に相当するアミノ酸において起こる。関連する実施態様において、このような突然変異としては、以下に示す1またはそれより多くのBRAF残基：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、V483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fが挙げられる。

30

40

50

## 【 0 0 9 2 】

B R A Fタンパク質は、好ましくは組換えDNA技術によって生産される。例えばB R A Fタンパク質をコードする核酸分子は、(上述したように)発現ベクターにクローニングされ、発現ベクターは、(上述したように)宿主細胞に導入され、宿主細胞中でB R A Fタンパク質が発現される。続いて標準的なタンパク質精製技術を用いた適切な精製スキームによってこれらの細胞から4 B R A Fタンパク質を単離することができる。組換え発現の代わりに、B R A Fタンパク質、ポリペプチドまたはペプチドは、標準的なペプチド合成技術を用いて化学合成してもよい。さらに、天然型B R A Fタンパク質および/または突然変異型B R A Fタンパク質は、例えば抗B R A F抗体を用いて細胞(例えば癌細胞)から単離することもでき、このような抗体は、標準的な技術によって本発明のB R A F

10

## 【 0 0 9 3 】

本発明はまた、B R A Fキメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書で用いられるように、B R A F「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非B R A Fポリペプチドに作動可能に結合したB R A Fポリペプチドを含む。「B R A Fポリペプチド」は、B R A Fタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、それに対して「非B R A Fポリペプチド」は、実質的にB R A Fタンパク質に相同ではないタンパク質、例えばB R A F活性を示さず、同じまたは異なる生物から誘導された実質的にB R A Fタンパク質と異なるタンパク質に相当するアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。融合タンパク質において、用語「作動可能に結合した」は、B R A Fポリペプチドおよび非B R A Fポリペプチドが、フレーム内で互いに融合していることを示すこととする。非B R A Fポリペプチドは、B R A FポリペプチドのN末端またはC末端に融合していてもよい。例えば、一実施態様において、このような融合タンパク質は、B R A F配列がG S T配列のC末端に融合したG S T - B R A F融合タンパク質である。このような融合タンパク質は、組換えB R A Fタンパク質の精製を容易にすることができる。その他の実施態様において、このような融合タンパク質は、N末端に異種シグナル配列を含むB R A Fタンパク質である。所定の宿主細胞(例えば哺乳動物宿主細胞)において、異種シグナル配列の使用によってB R A Fタンパク質の発現および/または分泌を高めることができる。

20

## 【 0 0 9 4 】

好ましくは、本発明のB R A Fキメラまたは融合タンパク質は、標準的な組換えDNA技術によって生産される。例えば異なるポリペプチド配列をコードするDNAフラグメントは、従来の技術によって、例えばライゲーションのための平滑末端またはジグザグ状の末端、適切な末端にするための制限酵素消化、必要に応じて付着末端の穴埋め(filling-in)、望ましくない結合を回避するためのアルカリホスファターゼ処理、および、酵素によるライゲーションを用いることによって、フレーム内にまとめてライゲーションされる。その他の実施態様において、このような融合遺伝子は、自動DNA合成装置などの従来の技術によって合成することができる。あるいは、2つの連続した遺伝子フラグメント間に相補的なオーバーハングを形成するアンカープライマーを用いて遺伝子フラグメントのP C R増幅を行うことができ、続いてこのオーバーハングをアニールし再度増幅させて、キメラ遺伝子配列を生成することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al編集, ジョン・ワイリー & サンズ(John Wiley & Sons): 1992を参照)。さらに、予め融合部分(例えばG S Tポリペプチド)がコードされた発現ベクターが多数市販されている。このような発現ベクターに、B R A Fをコードする核酸を、融合部分がフレーム内でB R A Fタンパク質に連結されるようにしてクローニングすることができる。

30

40

## 【 0 0 9 5 】

好ましい実施態様において、本発明の単離したB R A Fポリペプチドは、野生型B R A Fポリペプチド配列に比べて1種またはそれより多くの突然変異(例えば置換または欠失)を含む。一実施態様において、突然変異型B R A Fポリペプチドは、ヒト野生型B R A

50

Fポリペプチド配列（配列番号2）に比べて1種またはそれより多くの突然変異を含む。特に好ましい実施態様において、このような1種またはそれより多くの突然変異は、BRA F阻害剤に対する耐性を付与する。代表的な実施態様において、BRA F阻害剤は、RA F-265である。本発明の突然変異型BRA Fタンパク質は、野生型BRA Fタンパク質に特徴的な生物活性を示す。このような生物活性としては、例えばMEK1またはMEK2のリン酸化が挙げられる。典型的な本発明の突然変異型BRA Fポリペプチドとしては、野生型ヒトBRA Fポリペプチドと比べて、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸残基：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、または、C748に突然変異を含むBRA Fポリペプチドが挙げられる。また典型的な本発明の突然変異型BRA Fポリペプチドとしては、野生型ヒトBRA Fタンパク質と比べて、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸置換：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fを含むBRA Fポリペプチドも挙げられる。

10

#### 【0096】

突然変異型BRA Fタンパク質は、野生型BRA Fタンパク質、または、野生型BRA Fタンパク質をコードする核酸分子の変異誘発によって生成することができる。また突然変異型BRA Fタンパク質は、例えばBRA F阻害剤に対する耐性などの望ましい活性を有する突然変異型BRA Fタンパク質に関してBRA F突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって同定することもできる。当業界において、点突然変異またはトランケーションによって製造されたコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする技術や、選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングする技術など様々な技術がよく知られている。このような技術は、コンビナトリアル変異誘発によって生成した遺伝子ライブラリーの迅速スクリーニングに適用することができる。大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするためのハイスループット解析で処理することができる汎用の技術は、典型的には、遺伝子ライブラリーを複製可能な発現ベクターにクローニングすること、細胞を結果得られたベクターライブラリーを適切で形質転換すること、および、望ましい活性を検出することによって生成物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離が容易になるような条件下でコンビナトリアル遺伝子を発現すること、を含む。

20

30

#### 【0097】

##### VII I . 突然変異の検出

その他の形態において、本発明は、サンプル（例えば癌患者からの生体サンプル）中の突然変異型BRA Fタンパク質の存在を検出する方法に関する。サンプル中の、例えば核酸および/またはポリペプチドサンプル中の本発明の突然変異型BRA Fタンパク質の存在を検出するのに、様々なスクリーニング方法を用いることができる。具体的な実施態様において、このようなサンプルは、細胞または細胞抽出物を含む。代表的な実施態様において、このようなサンプルは、被験者、例えば癌を有する被験者から得られたものである。

40

#### 【0098】

BRA Fタンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分をコードする配列を含むゲノムDNA、cDNAおよびRNA（すなわちmRNA）中の耐性突然変異の存在を検出する方法を本発明の範囲内で用いることができる。同様に、BRA Fポリペプチドまたはそれらの生物学的に活性な部分中の耐性突然変異の存在を検出する方法も本発明の範囲内で用いることができる。具体的な実施態様において、これらに限定されないが、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸残基：A29、H72、S113、S124、P16

50

2、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、または、C748に突然変異を有する、BR AFポリペプチドまたはBR AFポリペプチドをコードする核酸分子の存在を検出する方法を用いることができる。代表的な実施態様において、これらに限定されないが、以下に示す1種またはそれより多くの突然変異：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fを有するBR AFポリペプチドまたはBR AFポリペプチドをコードする核酸分子の存在を検出する方法を用いることができる。

10

## 【0099】

点突然変異は、例えば、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（「DGGE」）、制限酵素断片長多型解析（「RFLP」）、化学的または酵素的な切断方法、PCRによって増幅した標的領域の直接的な配列解析（上記を参照）、一本鎖高次構造多型分析（「SSCP」）、ポリメラーゼ連鎖反応、配列解析、ハイブリダイゼーション、パイロシーケンシングまたは単一の分子配列解析後の「ハイブリッドキャプチャー」、およびその他の当業界でよく知られている方法などの方法を用いて検出することができる。点突然変異に関してスクリーニングする方法の一つは、RNA/DNAまたはRNA/RNAヘテロ二重鎖における塩基対ミスマッチのRNアーゼ切断に基づく方法である。本明細書で用いられる用語「ミスマッチ」は、二本鎖RNA/RNA、RNA/DNAまたはDNA/DNA分子中の1またはそれより多くの対になっていない、または誤って対になったヌクレオチドの領域と定義される。従ってこの定義は、挿入/欠失による突然変異、加えて単一または複数の塩基の点突然変異によるミスマッチも含む。米国特許第4,946,773号は、一本鎖DNAまたはRNA試験サンプルをRNAプローブにアニーリングし、続いてこの核酸二重鎖をRNアーゼAで処理することを含む、RNアーゼAのミスマッチ切断分析を説明している。ミスマッチを検出するために、電気泳動を用いてサイズで分離したRNアーゼA処理の一本鎖産物は、同様に処理したコントロール二重鎖と比較される。コントロール二重鎖では観察されなかった比較的小さいフラグメント（切断産物）を含むサンプルを陽性としてスコア付けする。

20

30

## 【0100】

その他の研究者は、ミスマッチ分析におけるRNアーゼIの使用を説明している。例えば、プロメガ（Promega）はRNアーゼIを含むキットを販売しており、このRNアーゼIは、4種の既知のミスマッチのうち3種を切断することが報告されている。またその他の研究者が、MutSタンパク質または単一の塩基のミスマッチ検出のためのその他のDNA修復酵素を用いたものも説明している。

## 【0101】

本発明の実施で用いることができる欠失、挿入または置換による突然変異を検出する代替の方法が、米国特許第5,849,483号、5,851,770号、5,866,337号、5,925,525号および5,928,870号に開示されている（これらそれぞれの全体が、参照により本明細書に組み入れられる）。

40

## 【0102】

スクリーニング方法は、上記で同定された突然変異の出現について個体をスクリーニングするために行うことができる。例えば、一実施態様において、サンプル（例えば血液もしくはその他の体液、または、細胞もしくは組織サンプル）を遺伝子型解析のために患者から採取する。代表的な実施態様において、患者は癌患者である。本明細書において説明される1種またはそれより多くの突然変異の存在または非存在によって、スクリーニングされた個体が第一世代のBR AF阻害剤を用いた治療に対して耐性を有する能力があるかどうか決定される。このような結果は、本発明によって提供される方法に従って、第一世代のBR AF阻害剤の用量を調節および/または変更したり、または、第二世代のBR

50

A F 阻害剤を用いた治療方針を選択したりするのに用いられると予想される。癌を有する被験者の有効な治療は、癌細胞の根絶、癌（例えば固形腫瘍）の増殖の停止または増殖速度の低減、または、癌の症状の少なくとも1つの改善を含んでいてもよい。

### 【0103】

BRAFポリペプチドまたはBRAFポリペプチドをコードする核酸分子における耐性突然変異は、当業界でよく知られているあらゆる適切な方法またはそれらの改変法を用いて検出することができ、このような方法としては以下で説明される方法がある。このような方法としては、対立形質特異的なポリメラーゼ連鎖反応の使用、直接または間接的な部位の配列解析、制限酵素の使用（それぞれの部位の対立遺伝子が制限部位を形成しているかまたは破壊している）、対立形質特異的なハイブリダイゼーションプローブの使用、突然変異型BRAFポリペプチドに特異的な抗体の使用、または、その他のあらゆる生化学的な分析法が挙げられる。

10

### 【0104】

#### 1. DNAの配列解析

突然変異を特徴付けるための最も一般的に使用される方法は、両側に多型を有する遺伝子座の直接のDNA配列解析（direct DNA sequencing of the genetic locus that flanks and includes the polymorphism）である。このような解析は、「サンガー法」としても知られている「ジデオキシ鎖終結方法」（Sanger, F., et al., 1975）、または、「マクサム・ギルバート法」としても知られている「化学分解法」（Maxam, A. M., et al., 1977）のいずれかを用いて達成することができる。望ましい遺伝子の回収を容易にするために、配列解析と、ポリメラーゼ連鎖反応のようなゲノム配列特異的な増幅技術とを併用してもよい（Mullis, K. et al., 1986；欧州特許出願第50,424号；欧州特許出願第84,796号；欧州特許出願第258,017号；欧州特許出願第237,362号；欧州特許出願第201,184号；米国特許第4,683,202号；4,582,788号；および、4,683,194号、これらはいずれも参照により本明細書に組み入れられる）。またプールしたサンプルの配列解析は、ソレクサ（Solexa）/イルミナ（Illumina）の配列解析（イルミナ（Illumina(R)）、カリフォルニア州サンディエゴ）、パイロシーケンシング、または、その他の単一の分子を配列解析するアプローチを用いて達成することもできる。

20

### 【0105】

#### 2. エキソヌクレアーゼ耐性

突然変異した部位に存在するヌクレオチドの同一性を決定するのに用いることができるその他の方法としては、特殊化したエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体を利用する方法がある（米国特許第4,656,127号）。3'直後から多型の部位の対立遺伝子の配列に相補的なプライマーを調査対象のDNAにハイブリダイズさせる。DNA上の多型の部位が、存在する特定のエキソヌクレオチド耐性のヌクレオチド誘導体に相補的なヌクレオチドを含む場合、その誘導体は、ポリメラーゼによってハイブリダイズしたプライマーの末端に取り込まれると予想される。このような取り込みによって、プライマーはエキソヌクレアーゼの切断に対して耐性になり、その検出が可能になる。エキソヌクレオチド耐性の誘導体の同一性は既にわかっているため、DNAの多型の部位に存在する特定のヌクレオチドを決定することができる。

30

40

### 【0106】

#### 3. マイクロシーケンス方法

DNA中の突然変異部位を分析するための様々なその他のプライマー誘導ヌクレオチド取り込み法が説明されている（Komher, J. S. et al., 1989；Sokolov, B. P., 1990；Syvanen 1990；Kuppuswamy et al., 1991；Prezant et al., 1992；Ugozzoli, L. et al., 1992；Nyren et al., 1993）。これらの方法は、突然変異部位における塩基を区別するための標識されたデオキシヌクレオチドの取り込みによるものである。シグナルは取り込まれたデオキシヌクレオチドの数に比例するため、同じヌクレオチド鎖に起った突然変異によって、鎖の長さに比例するシグナルが生じる（Syvanen et al., 1993）。

50

## 【 0 1 0 7 】

4. 溶液中での伸長

フランス国特許第 2, 6 5 0, 8 4 0 号および P C T 出願番号 W O 9 1 / 0 2 0 8 7 は、溶液ベースの突然変異部位のヌクレオチドの同一性の決定方法を論じている。これらの方法によれば、対立遺伝子の配列の 3' の直後から多型の部位に相補的なプライマーが用いられる。その部位が多型の部位のヌクレオチドに相補的な場合、プライマーの末端に取り込まれた標識されたジデオキシヌクレオチド誘導体を用いてその部位のヌクレオチドの同一性が決定される。

## 【 0 1 0 8 】

5. 遺伝学的なビット (Bit<sup>TM</sup>) 解析または固相での伸長

P C T 出願第 9 2 / 1 5 7 1 2 号は、標識されたターミネーターと 3' から多型の部位の配列に相補的なプライマーとの混合物を使用する方法を説明している。取り込まれた標識されたターミネーターが評価対象の標的分子の多型の部位に存在するヌクレオチドに相補的なので、同定される。ここでこのようなプライマーまたは標的分子は固相に固定される。

10

## 【 0 1 0 9 】

6. オリゴヌクレオチドライゲーション分析 (O L A)

オリゴヌクレオチドライゲーション分析は、上述したものと異なる方法論を利用する固相方法である (Landegren et al., 1988)。標的 D N A の一本鎖の隣接する配列にハイブリダイゼーション可能な 2 種のオリゴヌクレオチドを利用する。これらのオリゴヌクレオチドのうち一方はピオチン化されており、他方は、検出可能に標識されている。標的分子に正確な相補配列が見出される場合、オリゴヌクレオチドは、それらの末端を隣り合わせてライゲーションの基質が形成されるようにハイブリダイズすると予想される。ライゲーションにより、アビジンを用いた標識されたオリゴヌクレオチドの回収が可能になる。また、この方法に基づくその他の P C R 併用の核酸検出分析も説明されている (Nicker son et al., 1990)。ここで P C R は、標的 D N A を指数関数的な増幅を達成するのに用いられており、続いて標的 D N A は O L A を用いて検出される。

20

## 【 0 1 1 0 】

7. リガーゼ / ポリメラーゼが仲介する遺伝学的ビット (Bit) 解析

米国特許第 5, 9 5 2, 1 7 4 号は、同様に標的分子の隣接する配列にハイブリダイゼーションすることができる 2 種のプライマーを用いる方法を説明している。標的が固定された固体支持体上にハイブリダイズした生成物が形成される。ここで、プライマーが、ヌクレオチド 1 つのスペースをあけて互いに分離されるようにハイブリダイゼーションが起こる。このハイブリダイズした生成物を、ポリメラーゼ、リガーゼ、および、少なくとも 1 種のデオキシヌクレオチド三リン酸を含むヌクレオチド三リン酸の混合物の存在下でインキュベートすることにより、あらゆる隣接するハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド対のライゲーションが可能になる。リガーゼ添加により、シグナル、伸長およびライゲーションの発生に必要な 2 つの現象が起こる。それにより、伸長またはライゲーションのいずれか単独を用いた方法よりも特異性が高く、かつ「ノイズ」も低くなり、さらに、ポリメラーゼベースの分析とは異なり、この方法と第二のハイブリダイゼーションおよび固相に結合するシグナルのライゲーション工程とを組み合わせることによって、この方法はポリメラーゼ工程の特異性を強化する。

30

40

## 【 0 1 1 1 】

8. 核酸の転移方法

本発明の方法のうちいくつかにおいて、核酸の転移方法を用いることができる。本発明の組成物を発現させるための核酸の送達に適した方法は、本明細書で説明されているように、または、当業者が熟知していると思われるように、核酸 (例えば D N A、例えばウイルスおよび非ウイルスベクターなど) を細胞器官、細胞、組織または生物に導入することができる実質的にはほとんどすべての方法を含むと考えられる。このような方法としては、これらに限定されないが、例えば注射による直接の D N A 送達 (米国特許第 5, 9 9 4

50

、624号、5,981,274号、5,945,100号、5,780,448号、5,736,524号、5,702,932号、5,656,610号、5,589,466号および5,580,859号、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる)、例えばマイクロインジェクションなど(Harlan and Weintraub, 1985; 米国特許第5,789,215号、参照により本明細書に組み入れられる); エレクトロポレーションによる方法(米国特許第5,384,253号、参照により本明細書に組み入れられる); リン酸カルシウム沈殿による方法(Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe et al., 1990); D E A E - デキストラン、続いてポリエチレングリコールを用いることによる(Gopal, 1985); 直接の超音波処理しながらのローディングによる方法(Fechheimer et al., 1987); リポソームが媒介するトランスフェクションによる方法(Nicolau and Sene, 1982; Fraley et al., 1979; Nicolau et al., 1987; Wong et al., 1980; Kaneda et al., 1989; Kato et al., 1991); 微粒子銃による方法(PCT出願番号WO94/09699および95/06128; 米国特許第5,610,042号; 5,322,783号、5,563,055号、5,550,318号、5,538,877号および5,538,880号、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる); 炭化ケイ素繊維での攪拌による方法(Kaeppler et al., 1990; 米国特許第5,302,523号および5,464,765号、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる); アグロバクテリウム属が媒介する形質転換による方法(米国特許第5,591,616号および5,563,055号、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる); プロトプラストのPEGが媒介する形質転換による方法(Omirulleh et al., 1993; 米国特許第4,684,611号および4,952,500号、それぞれ参照により本明細書に組み入れられる); または、枯渇/阻害が媒介するDNAの取り込みによる方法(Potrykus et al., 1985)が挙げられる。このような技術の適用により、細胞器官、細胞、組織または生物を、安定して、または一時的に形質転換させることができる。

#### 【0112】

##### 9. 対立形質特異的な抗体

本明細書において説明される1またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFポリペプチドは、突然変異型BRAFポリペプチドを特異的に認識するが野生型BRAFポリペプチドを認識しない抗体を用いて検出が可能である。1またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFポリペプチドの1種またはそれより多くの対立形質に対して抗体を発生させることができる。ペプチドまたはタンパク質上のエピトープを特異的に認識する抗体を惹起する抗原として特異的なタンパク質またはオリゴペプチドを用いるための技術は、よく知られている。一実施態様において、標的遺伝子の望ましい対立形質のDNA配列は、適切な発現ベクターに挿入することによりクローニングし、続いて原核または真核宿主細胞中でタンパク質に翻訳することができる。このようなタンパク質を回収して、特異的な抗体の生産を惹起する抗原として使用することができる。その他の実施態様において、標的遺伝子の望ましい対立形質のDNAをPCR技術で増幅させ、その後インビトロでタンパク質に翻訳して、特異的な抗体の生産を惹起するための抗原として使用することができる。第三の実施態様は、特異的な抗体の生産を惹起する抗原として使用するために、対立遺伝子のアミノ酸配列を示す合成ペプチドを生成する基礎として、代替の対立遺伝子のDNA配列を使用することである。

#### 【0113】

抗体は、標準的なモノクローナル抗体技術による生成、または、組換えベースの発現系による生成のいずれかによって行うことができる。一般論として、Abbas, Lichtman, and Pober, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Co. (1991)を参照。用語「抗体」は、抗原に特異的に結合することができる無傷の抗体分子、加えて抗体フラグメントまたは誘導体、例えばFabおよびF(ab')<sub>2</sub>などを意味する。このようにして生産された抗体は、抗体を形成するために抗原として用いられた対立形質で生産された突然変異体タンパク質のみに選択的に結合すると予想される。また、対立形質特異的な抗体を生成する方法は、米国特許第6,200,754号、および、米国特許第6,054,

273号(これらの全内容は参照により本明細書に組み入れられる)でも説明されている。

【0114】

このような突然変異型BRAFポリペプチドに特異的な抗体は、当業界でよく知られている技術を用いて、サンプル中で、例えば分析サンプル、細胞サンプル、細胞抽出物、生体サンプルまたは患者サンプル中で、1種またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFポリペプチドの存在を検出するのに用いることができる。このような技術としては、例えば、ウェスタンブロット、免疫組織化学、間接免疫蛍光法、および、抗体マイクロアレイが挙げられる。また突然変異型BRAFポリペプチドを特異的に認識する抗体は、第二世代のBRAF阻害剤である可能性もある。突然変異型BRAFポリペプチドの生物活性を阻害する突然変異型BRAFポリペプチドを特異的に認識する抗体の能力は、本明細書において説明される第二世代のBRAF阻害剤を同定する方法を用いて決定することができる。

10

【0115】

IX. 診断剤およびスクリーニングの適用

前述の技術は、患者から得られたサンプル中で、BRAF核酸またはポリペプチド分子中の予め同定された耐性突然変異の存在または非存在を決定するのに用いることができる。患者サンプル中の突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子の同定は、患者の病気または状態を特徴付けるのに有用な可能性がある。例えば、BRAFの異常な発現または活性化に関連する病気(例えば癌)を有する患者の場合、患者から得られたサンプル(例えば癌細胞を含むサンプル)に突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子が同定された場合、それは、その患者が、比較的高い再発の危険を有するか、または、BRAF阻害剤での治療に対して反応しないことを示す。一実施態様において、患者から得られた癌細胞を含むサンプルに本明細書において説明される1種またはそれより多くの突然変異を含むBRAF核酸またはポリペプチド分子が同定された場合、それは、その患者が、比較的高い再発の危険を有するか、または、第一世代のBRAF阻害剤、例えばRAF-265での治療に対して反応しないことを示す。

20

【0116】

本明細書において説明されるBRAF耐性突然変異を有する患者は、第一世代のBRAF阻害剤での治療後、BRAF耐性突然変異を検出できない患者よりも高い再発の危険を有する。従って、本明細書で用いられる用語「比較的高い再発の危険」は、突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子を検出することができない患者と比較した場合である。すなわち、「比較的高い再発の危険」を有する患者は、突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子を検出することができない患者と比較して比較的高い再発の危険を有する患者である。

30

【0117】

所定の実施態様において、以下に示す1種またはそれより多くの残基：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748において突然変異を有するBRAFポリペプチドまたはBRAFポリペプチドをコードする核酸が同定された場合、それは、その患者が、比較的高い再発の危険を有するか、または、第一世代のBRAF阻害剤、例えばRAF-265での治療に対して反応しないことを示す。代表的な実施態様において、以下に示す1種またはそれより多くの耐性突然変異：RAF-265：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、または、C748Fを有するBRAFポリペプチドまたはBRAFポリペプチドをコードする核酸が同定された場合、それは、その患者が、比較的高い再発の危険を有するか、または、例

40

50

例えばBRAF阻害剤での治療に対して反応しないことを示す。

【0118】

また、患者サンプル中の突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子の存在または非存在を決定することによっても、患者にとって最適化された治療計画を選択すること、または、患者を所定の治療群に層別化することが可能である。一実施態様において、患者からの癌細胞を含むサンプルが突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子を含まない場合、その患者には第一世代のBRAF阻害剤での治療を含む治療計画が選択される。このような患者は、第一世代のBRAF阻害剤を含む治療計画に層別化することができる。このような患者には、BRAF阻害剤を標準的な用量および標準的な投与インターバルで投与することができる。

10

【0119】

その他の実施態様において、患者からの癌細胞を含むサンプルが、突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子、例えば本明細書において説明される1種またはそれより多くの上記突然変異を含むBRAF核酸またはポリペプチド分子を含む場合、その患者にはBRAF阻害剤を使用しない治療を含む治療計画が選択される。このような患者は、BRAF阻害剤を含まない治療計画に層別化することができる。

【0120】

その他の実施態様において、患者からの癌細胞を含むサンプルが、突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子を含む場合、その患者には高い用量の第一世代のBRAF阻害剤での治療を含む治療計画が選択される。このような患者は、高い用量の第一世代のBRAF阻害剤を含む治療計画に層別化することができる。前述の実施態様の典型的な形態において、第一世代のBRAF阻害剤は、RAF-265である。

20

【0121】

その代わりに実施態様において、患者から得られた癌細胞を含むサンプルで突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子が同定された場合、それは、その患者が、第二世代のBRAF阻害剤での治療に反応する可能性が高いことを示す。従って、一実施態様において、患者からの癌細胞を含むサンプルが、突然変異型BRAF核酸またはポリペプチド分子を含む場合、その患者には第二世代のBRAF阻害剤での治療を含む治療計画が選択される。このような患者は、第二世代のBRAF阻害剤を含む治療計画に層別化することができる。

30

【0122】

前述の実施態様の具体的な形態において、突然変異型BRAFポリペプチドは、以下に示す1種またはそれより多くの残基：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に突然変異を有する。代表的な実施態様において、突然変異型BRAFポリペプチドは、以下に示す1種またはそれより多くの突然変異：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fを有する。好ましい実施態様において、突然変異型BRAF核酸分子は、1またはそれより多くの前述のアミノ酸残基に突然変異を含む突然変異型BRAFポリペプチドをコードする。

40

【0123】

従って、一実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療を最適化する方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；および、BRAFポリペプチドをコードする核酸分子を配列解析すること、を含み；ここで、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P6

50

55、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPオリペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドが存在する場合、それは、その被験者をMEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤で治療する必要があることを示す。

【0124】

その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療を最適化する方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；および、サンプルをPCRで処理し、BRAFPオリペプチドをコードする核酸分子のヌクレオチド配列を同定すること、を含み；ここで、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPオリペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドが存在する場合、それは、その被験者をMEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤で治療する必要があることを示す。

10

【0125】

その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；BRAFPオリペプチドをコードする核酸分子を配列解析すること；および、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPオリペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドが上記核酸分子に含まれる場合、被験者にMEK阻害剤または第二世代のBRAFP阻害剤を投与すること、を含む。

20

【0126】

その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；サンプルをPCRで処理し、BRAFPオリペプチドをコードする核酸分子のヌクレオチド配列を同定すること；および、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPオリペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドをが上記核酸分子に含まれる場合、被験者にMEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤を投与すること、を含む。

30

【0127】

その他の実施態様において、本発明は、MEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤での治療によって利益を得る可能性が高い癌を有する被験者の同定方法を提供し、本方法は、癌から得られた核酸サンプルを、BRAFPオリペプチドをコードする核酸分子中に、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPオリペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸残基の同一性を変更する1またはそれより多くの突然変異が存在するかどうかについて分析すること；および、BRAFPオリペプチドをコードする核酸分子中

40

50

の1種またはそれより多くの突然変異の存在を、MEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤での治療によって利益を得る可能性が高い被験者と関連付けること、を含む。

【0128】

その他の実施態様において、本発明は、MEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤での治療によって利益を得る可能性が高い癌を有する被験者の同定方法を提供し、本方法は、癌から得られた核酸サンプルを、BRAFPoliペプチドをコードする核酸分子中の、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPoliペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸残基の同一性を変更する1またはそれより多くの突然変異の存在について分析すること；および、BRAFPoliペプチドをコードする核酸分子中の1種またはそれより多くの突然変異の存在を、MEK阻害剤または第二世代のRAF阻害剤での治療によって利益を得る可能性が高い被験者と関連付けること、を含む。

10

【0129】

前述の形態の様々な実施態様において、MEK阻害剤は、CI-1040、AZD6244、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119、6-メトキシ-7-(3-モルホリン-4-イル-プロポキシ)-4-(4-フェノキシ-フェニルアミノ)-キノリン-3-カルボニトリル、または、4-[3-クロロ-4-(1-メチル-1H-イミダゾール-2-イルスルファニル)-フェニルアミノ]-6-メトキシ-7-(3-モルホリン-4-イル-プロポキシ)-キノリン-3-カルボニトリル、または、それらの組み合わせである。

20

【0130】

その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者が第一世代のBRAFPoli阻害剤での治療の間高い再発の危険を有することを同定する方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；および、BRAFPoliペプチドをコードする核酸分子を配列解析すること、を含み；ここで、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPoliペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドが存在する場合、その被験者が第一世代のBRAFPoli阻害剤での治療の間高い再発の危険を有することを同定する。

30

【0131】

その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者が第一世代のBRAFPoli阻害剤での治療に対して反応しないことを同定する方法を提供し、本方法は、癌細胞から核酸を抽出すること；および、BRAFPoliペプチドをコードする核酸分子を配列解析すること、を含み；ここで、配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748からなる群より選択される1またはそれより多くの位置におけるアミノ酸に関して、コードされたBRAFPoliペプチドの1またはそれより多くのアミノ酸におけるアミノ酸残基の同一性を変更するヌクレオチドが存在する場合は、その被験者が第一世代のBRAFPoli阻害剤での治療に対して反応しないことを同定する。

40

【0132】

前述の形態の様々な実施態様において、RAF阻害剤は、RAF265、または、PLX4720である。前述の形態のいくつかの実施態様において、癌は、白血病、リンパ腫

50

、骨髄腫、癌腫、転移性癌、肉腫、腺腫、神経系癌、および、尿生殖器癌からなる群より選択される。その他の実施態様において、癌は黒色腫である。

【 0 1 3 3 】

X. 治療方法

様々な実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療方法を提供する。代表的な実施態様において、被験者は、1種またはそれより多くの突然変異、例えば本明細書において説明される1種またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFポリペプチドを含む癌を有する。関連する実施態様において、被験者は、1種またはそれより多くの突然変異、例えば本明細書において説明される1種またはそれより多くの耐性突然変異を有するBRAFポリペプチドをコードする核酸分子を含む癌を有する。用語「治療した」、「を治療すること」または「治療」は、治療しようとする状態に伴う症状の少なくとも1つを低減または緩和することを含む。例えば、治療によって、例えば癌のような疾患の1種または数種の症状を減少させるか、または、完全に根絶することができる。同様に、化合物の治療有効量とは、治療しようとする状態に伴う症状の少なくとも1つを減少または緩和するのに十分な量である。

10

【 0 1 3 4 】

従って、いくつかの実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療方法を提供し、本方法は、被験者に第二世代のRAF阻害剤を投与することを含む。その他の実施態様において、本発明は、癌を有する被験者の治療方法を提供し、本方法は、被験者にMEK阻害剤を投与することを含む。前述の形態の代表的な実施態様において、癌中に、BRAFポリペプチドまたはBRAFポリペプチドをコードする核酸分子中の、本明細書において説明されているような1種またはそれより多くのBRAF阻害剤に対する耐性を付与する1種またはそれより多くの突然変異が同定される。例えば、本発明は、任意にV600EにBRAF突然変異を有することに加えて、以下に示す1種またはそれより多くのBRAF中の位置：配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748にアミノ酸置換を含む癌の治療方法を提供し、前記方法は、被験者に治療有効量の第二世代のBRAF阻害剤を投与することを含む。本発明はさらに、任意にV600EにBRAF突然変異を有することに加えて、以下に示す1種またはそれより多くのBRAF中の位置：配列番号2または配列番号4のA29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748にアミノ酸置換を含む癌の治療方法を提供し、前記方法は、被験者に治療有効量のMEK阻害剤を投与することを含む。RAF下流でMEKが活性化されると、MEK阻害剤は、本明細書において説明される1種またはそれより多くのRAF耐性突然変異を有する細胞中のRAFシグナル伝達をうまく阻害することができる。

20

30

【 0 1 3 5 】

本発明を実施するのに適したMEK阻害剤としては、これらに限定されないが、I-1040、AZD6244、PD318088、PD98059、PD334581、RDEA119、6-メトキシ-7-(3-モルホリン-4-イル-プロポキシ)-4-(4-フェノキシ-フェニルアミノ)-キノリン-3-カルボニトリル、4-[3-クロロ-4-(1-メチル-1H-イミダゾール-2-イルスルファニル)-フェニルアミノ]-6-メトキシ-7-(3-モルホリン-4-イル-プロポキシ)-キノリン-3-カルボニトリル、および、ロシュ(Roche)製の化合物RG7420が挙げられる。本発明を実施するのに適したさらなるMEK阻害剤としては、これらに限定されないが、WO2008076415、US20080166359、WO2008067481、WO2008055236、US20080188453、US20080058340、WO2007014011、WO2008024724、US20080081821、WO2008024725、US20080085886、WO2008021389、WO2007123939、US20070287709、WO2007123936、US20070287737、US20070244164

40

50

、 WO2007121481、 US20070238710、 WO2007121269、 WO2007096259、 US20070197617、 WO2007071951、 EP1966155、 IN2008MN01163、 WO2007044084、 AU2006299902、 CA2608201、 EP1922307、 EP1967516、 MX200714540、 IN2007DN09015、 NO2007006412、 KR2008019236、 WO2007044515、 AU2006302415、 CA2622755、 EP1934174、 IN2008DN02771、 KR2008050601、 WO200702590、 US20070049591、 WO2007014011、 AU2006272837、 CA2618218、 EP1912636、 US20080058340、 MX200802114、 KR2008068637、 US20060194802、 WO2006133417、 WO2006058752、 AU2005311451、 CA2586796、 EP1828184、 JP2008521858、 US20070299103、 NO2007003393、 WO2006056427、 AU2005308956、 CA2587178、 EP1838675、 JP2008520615、 NO2007003259、 US20070293544、 WO2006045514、 AU2005298932、 CA2582247、 EP1802579、 CN101065358、 JP2008517024、 IN2007DN02762、 MX200704781、 KR2007067727、 NO2007002595、 JP2006083133、 WO2006029862、 US20060063814、 US7371869、 AU2005284293、 CA2579130、 EP1791837、 CN101023079、 JP2008513397、 BR2005015371、 KR2007043895、 MX200703166、 IN2007CN01145、 WO2006024034、 AU2005276974、 CA2578283、 US20060079526、 EP1799656、 CN101044125、 JP2008510839、 MX200702208、 IN2007DN02041、 WO2006018188、 AU2005274390、 CA2576599、 EP1781649、 CN101006085、 JP2008509950、 BR2005014515、 AT404556、 US20060041146、 MX200701846、 IN2007CN00695、 KR2007034635、 WO2006011466、 AU2005265769、 CA2575232、 EP1780197、 BR2005013750、 JP4090070、 MX200700736、 CN101124199、 KR2007041752、 IN2007DN01319、 WO2005121142、 AU2005252110、 CA2569850、 US20060014768、 US7378423、 EP1761528、 CN101006086、 AT383360、 BR2005011967、 JP2008501631、 EP1894932、 ES2297723、 MX2006PA14478、 NO2007000155、 IN2007CN00102、 KR2007034581、 HK1107084、 JP2008201788、 US20050256123、 US20050250782、 US20070112038、 US20050187247、 WO2005082891、 WO2005051302、 AU2004293019、 CA2546353、 US20050130943、 US20050130976、 US20050153942、 EP1689233、 JP2007511615、 WO2005051301AU2004293018、 CA2545660、 US20050130943、 US20050130976、 US20050153942、 EP1682138、 BR2004016692、 CN1905873、 JP2007511614、 MX2006PA05657、 IN2006DN03183、 NO2006002692、 KR2007026343、 WO2005028426、 EP1674452、 US20070105859、 US20050054701、 US7230099、 US20050049419、 US7144907、 AU2004270699、 CA2537321、 WO2005023759、 EP1673339、 BR2004014111、 CN1874769、 JP2007504241、 JP4131741、 US20060030610、 MX2006PA02466、 NO2006001506、 US20050049419、 US7144907、 US20050054701、 US7230099、 AU2004270699、 CA2537321、 WO2005023759、 EP1673339、 BR2004014111、 CN1874769、 JP2007504241、 JP4131741US20060030610、 MX2006PA02466、 IN2006DN01661、 NO2006001506、 US20060189808、 US20060189649、 US7271178、 US20060189668、 US20050049276、 WO2005009975、 CA2532067、 EP1651214、 BR2004012851、 JP2006528621、 US20050026970、 US7160915、 MX2006PA00921、 WO2005007616、 US20050059710、 WO2005000818、 US20050026964、 US7273877、 WO2004056789、 US20050004186、 CA2509405、 AU2003286306、 EP1578736、 BR2003017254、 JP2006516967、 MX2005PA06803、 WO2004044219、 AU2003291268、 WO2004041811、 AU2003278369、 EP1575943、 JP2006508944、 US20050282856、 US7173136、 US20070191346、 WO2004041185、 AU2003287366、 US20060270643、 WO2004030620、 AU2003275282、 US20040092514、 US7232826、 EP1545529、 US20040039037、 US6989451、 WO2003077855、 CA2478534、 AU2003220202、 US20030216460、 EP1482944、 CN1652792、 JP2005526076、 RU2300528、 BR2003006016、 MX2004PA08894、 US20060106225、 WO2003062191、 CA2473545、 EP1467968、 BR2003007060、 JP2005515253、 TW592692、 US20040006245、 US6891066、 MX2004PA05527、 US20050137263、 US7078438、 WO2003062189、 CA2472367、 EP1467965、 BR2003007071、 JP2005515251、 US20030232889、 US6770778、 MX2004PA05528、 WO2003047585、 AU2002347360、 WO2003047583、 AU2002365665、 WO2003047523、 CA2466762、 AU2002365899、 US20030125359、 US7307071、 JP2005526008、 EP1578346、 WO2003035626、 CA2463101、 AU2002359291、 EP1438295、 JP2005508972、 US20050054706、 US7253199、 US20070293555、 AU2008202731、 US6506798、 WO9901421、 WO2000041994、 US6310060、 WO2002006213、 CA2416685、 AU2001073498、 BR2001012584、 HU2003002781、 JP2004504294、 JP3811775、 EE200300030、 NZ524120、 AU2001273498、 IN2003MN00028、 NO2003000249、 KR773621、 MX2003PA00591、 HR2003000083、 BG107564、 ZA2003000348、 US20040054172、 US6960614、 HK1055943、 US20050176820、

US7411001、WO2000042029、JP2000204077、CA2355374、EP1144394、BR9916896、TR200102029、HU2001005092、JP2002534515、EE200100374、NZ513432、AT302761、ES2249060、ZA2001005219、MX2001PA06659、IN2001MN00785、NO2001003451、HR2001000525、BG105801、US6545030、HK1042488、US20030004193、WO2000042022、JP2000204079、CA2355470、EP1144385、BR9916904、TR200102030、HU2001005113、EE200100373、JP2002534510、NZ513433、AT302193、ES2247859、MX2001PA06568、ZA2001005224、IN2001MN00786、US6469004、NO2001003452、HR2001000524、BG105800、WO2000042003、JP2000212157、CA2349832、EP1144371、BR9916885、AT309205、ES2252996、MX2001PA04332、US6440966、US20030092748、US6750217、WO2000042002、JP2000204075、CA2349467、EP1144372、BR9916894、JP2002534497、AT311363、ES2251851、MX2001PA04331、US6455582、US20030045521、US6835749、WO2000037141、CA2352326、BR9916839、EP1140291、TR200101871、HU2001004844、JP2002532570、EE200100339、NZ512859、AT310567、ES2253928、ZA2001004277、MX2001PA05476、IN2001MN00673、NO2001003099、HR2001000473、BG105715、US20040171632、GB2323845、WO9901426、CA2290506、AU9882627、AU757046、EP993439、BR9810366、NZ501276、HU2000003731、JP2002511092、AT277895、IL132840、PT993439、ES2229515、TW396149、ZA9805728、MX9910649、NO9906491、NO315271、US20030078428、US6821963、US20050049429、US20060052608、US7169816、WO9901421、CA2290509、AU9882626、AU756586、EP993437、BR9810385、JP2002509536、NZ501277、AT344791、ES2274572、TW221831、ZA9805726、MX9910556、US6310060、US6506798、US20020022647、US6492363、US20030149015、および、US 7019033で説明されている化合物が挙げられる（これらの全内容は参照により本明細書に組み入れられる）。前述の化合物の投与量、製剤および投与様式は当業界でよく知られている。典型的な投与様式としては、これらに限定されないが、経口、皮下、静脈内、または、非経口が挙げられる。経口投与のための液状の投薬形態としては、これらに限定されないが、医薬的に許容されるエマルジョン、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップ、および、エリキシルが挙げられる。液状の投薬形態は、活性化合物に加えて、当業界において一般的に使用されている不活性希釈剤を含んでいてもよく、このような不活性希釈剤としては、例えば水またはその他の溶媒、可溶性剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、炭酸エチル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、安息香酸ベンジル、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ジメチルホルムアミド、油（具体的には、綿実油、ピーナッツ油、トウモロコシ油、胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油、および、ゴマ油）、クレモフォール（cremaphor）、グリセロール、テトラヒドロフルフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタン脂肪酸エステル、および、それらの混合物が挙げられる。経口用組成物は、不活性希釈剤の他にも、アジュバント、例えば湿潤剤、乳化および懸濁化剤、甘味剤、矯味矯臭剤、および、着色料を含んでいてもよい。経口投与のための固形の投薬形態としては、カプセル、錠剤、丸剤、粉末、および、顆粒が挙げられる。このような固形の投薬形態において、活性化合物は、少なくとも1種の不活性な医薬的に許容される賦形剤またはキャリアーと混合され、このような賦形剤またはキャリアーとしては、例えばクエン酸ナトリウム、または、リン酸ニカルシウム、および/または、a) 充填剤もしくは増量剤、例えばスターチ、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、および、ケイ酸、b) 結合剤、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギン酸塩、ゼラチン、ポリビニルピロリジノン、スクロース、および、アカシア、c) 湿潤剤、例えばグリセロール、d) 崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、ポテトまたはタピオカスターチ、アルギン酸、ある種のケイ酸塩、および、炭酸ナトリウム、e) 溶解遅延剤、例えばパラフィン、f) 吸収促進剤、例えば第四級アンモニウム化合物、g) 湿潤剤、例えばセチルアルコール、および、モノステアリン酸グリセロール、h) 吸収剤、例えばカオリン、および、ベントナイト粘土、および、i) 潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム、および、それらの混合物が挙げられ、さらに（j）物理的な混合物中または固体分散体の形態の場合、溶解速度促進剤、例えば高分子量ポリエチレングリコール、または、ポリビニルピロリドンも挙げられる。カプセル、

錠剤および丸剤の場合、その投薬形態は緩衝剤も含んでいてもよい。

【0136】

BRAF中の突然変異は概して多種多様の癌において耐性を強化することから、本明細書において説明される方法および第二世代のBRAF阻害剤は、固形腫瘍や血液の悪性疾患などの広範囲の癌の治療において有用である。このような腫瘍の例としては、これらに限定されないが、白血病、リンパ腫、骨髄腫、癌腫、転移性癌、肉腫、腺腫、神経系癌、および、尿生殖器癌が挙げられる。代表的な実施態様において、前述の方法は、成人および小児の急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌腫、AIDS関連の癌、肛門癌、虫垂癌、星状細胞腫、基底細胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨肉腫、線維性組織球腫、脳腫瘍、脳幹グリオーマ、小脳星状細胞腫、悪性神経膠腫、脳室上皮腫、髄芽細胞腫、テント上原始神経外胚葉腫瘍、視床下部膠腫、乳癌、男性乳癌、気管支腺腫、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、小脳星状細胞腫、悪性神経膠腫、子宮頸癌、小児癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患、結腸直腸癌、皮膚T細胞リンパ腫、子宮内膜癌、脳室上皮腫、食道癌、ユーイング肉腫、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、肝臓外胆管癌、眼内黒色腫、網膜芽腫、胆嚢癌、胃癌、消化管間質腫瘍、頭蓋外胚細胞腫瘍、性腺外胚細胞腫瘍、卵巣胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛性腫瘍、神経膠腫、ヘアリーセル白血病、頭頸部癌、肝細胞癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、視床下部および視覚路の神経膠腫、島細胞腫、カポジ肉腫、腎臓癌、腎細胞癌、喉頭癌、口唇および口腔癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、中枢神経系原発リンパ腫、ワルデンストレームのマクログロブリン血症、悪性線維性組織球腫、髄芽細胞腫、黒色腫、メルケル細胞癌、悪性中皮腫、頸部扁平上皮癌、多発性内分泌腫瘍症候群、多発性骨髄腫、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患、慢性骨髄増殖性疾患、鼻腔および副鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、口腔咽頭癌、卵巣癌、膵臓癌、副甲状腺癌、陰茎癌、咽頭癌、褐色細胞腫、松果体芽細胞腫およびテント上原始神経外胚葉腫瘍、下垂体癌、形質細胞腫、胸膜肺芽腫、前立腺癌、直腸癌、横紋筋肉腫、唾液腺癌、軟部組織肉腫、子宮肉腫、セザール症候群、非黒色腫皮膚癌、小腸癌、扁平上皮癌、頸部扁平上皮癌、テント上原始神経外胚葉腫瘍、睾丸癌、咽喉癌、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺癌、移行細胞癌、絨毛性腫瘍、尿道癌、子宮癌、子宮肉腫、膣癌、外陰癌、および、ウィルムス腫瘍を治療することにおいて有用である。

【0137】

XI. キット

本発明の一部として、様々なキットを組み立てることができる。キットは、特定の患者をBRAF阻害剤を用いた治療に対する耐性を生じさせる危険について評価するために、BRAF中の突然変異を分析する構成要素を含んでいてもよく、それにより、臨床医は、患者にとって代替の治療法が必要か否かを決定することができる。このようなキットは、突然変異を評価することができる試薬を含んでいてもよく、このような試薬としては、例えばBRAF阻害剤（例えばRAF-265）に対する耐性に関する表現型の出現と相関する突然変異を評価するためのプライマーセットが挙げられる。例えば、配列番号1の全部または一部に相補的な、または、それと同一のプライマー（またはプライマー対）が、キットの一部であることも考えられる。好ましい実施態様において、このようなプライマーは、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸残基：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に突然変異を含む突然変異型BRAFポリペプチドをコードする核酸分子を特異的に検出または増幅するのに用いることができる。代表的な実施態様において、このようなプライマーは、以下に示す1種またはそれより多くの突然変異：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T

10

20

30

40

50

、F738L、および、C748Fを含むBRAFポリペプチドをコードする核酸分子を、特異的に検出または増幅する。その他の実施態様において、本キットは、BRAFポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を増幅するために、配列番号1の全部または一部に相補的または同一なプライマーを使用するための説明書を含む。

【0138】

その他の実施態様において、本キットは、突然変異を含むBRAFポリペプチドを検出するための組成物、例えば1種またはそれより多くの耐性突然変異を含む突然変異型BRAFポリペプチドを特異的に認識する抗体を含む。典型的なポリペプチドとしては、以下に示す1種またはそれより多くのアミノ酸残基：A29、H72、S113、S124、P162、C194、L227、P231、C251、V291、Q329、K483、L485、T521、V528、D587、P655、S657、S683、P686、C696、L697、P722、F738、および、C748に突然変異を含む突然変異型BRAFポリペプチドが挙げられる。その他の実施態様において、突然変異型BRAFポリペプチドは、以下に示す1種またはそれより多くの突然変異：A29V、H72N、S113I、S124F、P162H、C194\*、L227F、P231T、C251F、V291F、Q329K、K483E、L485F、T521K、V528F、D587E、P655T、S657\*、S683R、P686Q、P686T、C696\*、L697I、P722T、F738L、および、C748Fを含む。

10

【0139】

上記で考察された特定の方法でBRAF突然変異を分析するために必要な必須の材料および試薬の全てが、キット中で一緒に組み立てられていてもよい。本キットの構成要素が1またはそれより多くの液状の溶液中に提供される場合、その液状の溶液は、好ましくは水溶液であり、特に好ましくは滅菌水溶液である。

20

【0140】

また本キットの構成要素は、乾燥形態または凍結乾燥形態で提供することもできる。試薬または構成要素が乾燥形態として提供される場合、一般的には、再溶解は、適切な溶媒を添加することによってなされる。また、このような溶媒がその他の容器手段に提供されることも想定される。

【0141】

また本発明のキットは、典型的には、例えば望ましいバイアルを保持する射出または吹込成形されたプラスチック容器のような、市販するために厳重な管理下でバイアルを収容するための手段を含むと予想される。容器の数またはタイプに関わりなく、本発明のキットはさらに、サンプル回収および評価を補助する装置を含むか、または、それらがパッケージ化されていてもよい。このような装置は、例えば、吸入器、注射器、ピペット、鉗子、計量スプーン、点眼器、またはそのような医学的に承認されたあらゆる運搬手段であり得る。

30

【0142】

本発明のキットはまた、患者において特定の突然変異が同定された場合、選択できる治療のうち推奨されるものの概略を示す説明書のシートを含んでもよい。例えば、本発明のキットに同梱される説明書のシートは、疾患（例えば癌）を有する患者において突然変異型BRAFポリペプチドが同定された場合、第一世代のBRAF阻害剤での治療を中止すること、第一世代のBRAF阻害剤での治療中に再発についてモニターすること、第一世代のBRAF阻害剤での治療を高用量で継続すること、または、第二世代のBRAF阻害剤での治療を開始させることを推奨することができる。同様に本発明のキットに同梱される説明書のシートは、障害を有する患者において突然変異型BRAFポリペプチドが検出できなかった場合、第一世代のBRAF阻害剤での治療を標準的な用量で継続することを推奨することができる。代表的な実施態様において、第一世代のBRAF阻害剤は、RAF-265である。

40

【0143】

以下の実施例で本発明をさらに説明するが、これらは、限定と解釈されるべきではない

50

。本願全体にわたり引用された全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0144】

実施例1：BRA F - V 6 0 0 Eランダム変異誘発のスクリーニング ( R A F 2 6 5 および P L X 4 7 2 0 )

公開された方法の改変法によって突然変異させたライブラリーを作製した。簡単に言えば、Mut S、Mut D 5 - およびMut T - DNA 修復遺伝子が欠失したE . coli ( X L 1 - レッド ; ストラタジーン ( Stratagene ) ) 中でBRA F ( V 6 0 0 E ) 発現プラスミド ( p W Z L - B l a s t - B R A F ( V 6 0 0 E ) ) を増殖させることにより変異誘発を行った。これらの細菌からプラスミドDNAを抽出し、X L 1 - ブルーE . coli ( ストラタジーン ) 中で増幅した。突然変異BRA F ( V 6 0 0 E ) プラスミドまたは非突然変異コントロールを用いて、A 3 7 5 黒色腫細胞に感染させた。プラスチジンで選択した後、細胞を15cmの培養皿で平板培養し、耐性クローンが出現するまで、R A F 阻害剤 ( R A F 2 6 5 または P L X 4 7 2 0 ; それぞれ2 μ M または1 . 5 μ M ) の存在下で5週間培養した。耐性クローンを配列解析して、高い頻度で出現した突然変異を同定した。図5と図6に結果を示す ( 図5 : R A F 2 6 5 のスクリーニング、および、図6 : P L X 4 7 2 0 のスクリーニング ) 。図7は、両方のスクリーニングにおいて高い頻度で発生した3種のBRA F 突然変異の位置を示す。

【0145】

実施例2：BRA F 突然変異体を含む細胞におけるpMEK 1 / 2 およびpERK 1 / 2 活性化のウェスタンブロット解析

293T細胞をそれぞれ推定上の耐性対立遺伝子に関するBRA F を含むpWZL ( B L A S T ) ( 6 μ g ) でトランスフェクションし、その後様々な濃度のBRA F ( V 6 0 0 E ) 阻害剤PLX 4 7 2 0 ( 0、0 . 0 8、0 . 4、2、5 および10 μ M ) で16時間処理した。標準的手法を用いて免疫ブロット実験を行った。簡単に言えば、処理された細胞をプロテアーゼ阻害剤 ( ロシュ ( Roche ) )、Na F およびNa VO 3 ( それぞれ1 mM ) を含むTNN緩衝液で溶解させた。溶解産物を定量し ( ブラッドフォード分析 )、変性させ ( 95 ° C )、および、SDSゲル電気泳動で分解した。タンパク質をニトロセルロースメンブレンに移し、BRA F を認識する一次抗体 ( サンタクルーズ ( S a n t a C r u z ) ; 1 : 1 0 , 0 0 0 の希釈液 )、p - ERK 1 / 2、p - MEK 1 / 2 ( S e r - 2 1 7 / 2 2 1 )、および、 - チュープリン ( セル・シグナリング・テクノロジー ( C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y ) ; 1 : 1 , 0 0 0 の希釈液 ) で検査した。適切な二次抗体 ( 抗ウサギまたは抗マウスIgG、HRP結合型 ; 1 : 1 , 0 0 0 の希釈液、セル・シグナリング・テクノロジー ) とインキュベートした後、タンパク質を化学発光 ( ピアース ( P i e r c e ) ) を用いて検出した。図8に結果を示す。そこで示したように、BRA F - V 6 0 0 E、BRA F - V 6 0 0 E - T 5 2 1 K、および、BRA F V 6 0 0 E - P 6 8 6 Q を含む細胞において、リン酸化MEK 1 / 2 およびERK 1 / 2 のレベルは増加した。リン酸化MEK 1 / 2 およびERK 1 / 2 の増加は、PLX 4 7 2 0 の濃度を増加させるにつれて、BRA F - V 6 0 0 E - T 5 2 1 K および BRA F V 6 0 0 E - P 6 8 6 Q 細胞において持続した。

【0146】

実施例3：BRA F キナーゼ分析

293T細胞 ( 70% のコンフルエント ) を推定上の耐性対立遺伝子であるBRA F ( V 6 0 0 E ) を含むpc - DNA - D E S T 4 0、キナーゼ欠損BRA F または野生型 ( 15 μ g ) でトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間で、標準的な方法によって溶解産物を作製した。1mgの全細胞抽出物を、コバルトビーズを用いて4で30分間沈殿させた。タンパク質が結合したコバルトビーズを、20 μ L のATP / マグネシウム混合物 ( 20 mM のM o p s ( pH 7 . 2 )、25 mM の - グリセロリン酸塩、5 mM のE G T A、1 mM のNa 3 V O 4、1 mM のD T T、75 mM のM g C l

2、および、0.5 mM ATP)、20 μLの希釈緩衝液(20 mMのMops、pH 7.2、25 mMのβ-グリセロールリン酸塩、5 mMのEGTA、1 mMのオルトバナジウム酸ナトリウム、1 mMのDTT)、および、1 μgの不活性なMEK1(ミリポア(Millipore)から入手)と共に30分で30分間インキュベートした。p-MEK1/2抗体(セル・シグナリング・テクノロジー)を用いた免疫染色によってリン酸化MEK1生成物を検出した。

【0147】

均等物

本明細書において特定の実施例および実施態様のみを参照しながら本発明を説明した。しかしながら可能な全ての本発明の実施例および実施態様を徹底的に説明する努力がなされた訳ではない。実際に、当業者であれば、以下の請求項で述べられる本発明の目的とする本質および範囲から逸脱することなく上述の実施例および実施態様に様々な付け足し、省略、改変などの変化を施すことができると予想される。このような全ての付け足し、省略、改変などの変化は、以下の請求項の範囲内に含まれるものとする。

10

【図1】

図1：ヒト BRAF 核酸配列 (配列番号1)  
(NCBI 参照配列番号: NM\_004333.4;gi187608632)

```

CGCCTCCCTTCCCCTCCCGCCGACAGGGCCGCTCGGGCCCGGCTCTCGGTTATAAGAT
GGCGGCGCTGAGCGGTGGCGGTGGTGGCGGCGGAGCCGGCCAGGCTCTGTTCAACGGG
GACATGGAGCCCGAGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CCATTCGCGGAGGAGGTGTGAATATCAACAATGATTAAAGTTGACACAGGAACATATAGAGG
CCTATTGGACAAATTTGGTGGGAGCATAATCCACCATCAATATATCTGGAGGCTATGAAGAA
ACACCAGCAAGCTAGATCCACTCCCAACAGAGAACACAGTTATTGGAATCTCTGGGGAACGG
AAGTGTATTTTGTGTTTCTACGCTGTGATGAATGGATACGTTACATCTCTTCTGCTCTTACGCT
TTGAGTGTACCTTCTCTCTTCTGAGTTTTCAAAATCCACAGATGTGGCAGGAGCAACCCCA
AGTCCACCAAAAACCTATCGTTAGAGTCTTCTGCCCAACAAACAGAGGACAGTGTACCTGC
AAGGTGTGGAGTTACAGTCCGAGACAGTCTAAAGAAAGCACTGATGATGAGAGGTTCAATCCCA
GAGTGTGTGCTGTTCAGAAATTCAGGATGGAGAGAAACCAATTTGGTGGGACACTGATA
TTTCTGGCTTACTGGAGAAGAAATTCATGTGGAAGTGTGGAGAATGTTCCACTACAACACAC
AACTTTGACGAAAACGGTTTTCACTTAGCATTTTGTGACTTTTGTGAAAGCTGCTTTTCCAG
GGTTTTCCGCTGTCAACATGTGGTTATAAATTTCCACAGCGTTGTAGTAGAGAAGTTCCACTGAT
GTGTTTAATTAACCAACTGATTTGCTGTTTGTCTCAAGTCTTTGAAACCCACCAATACC
ACAGGAAGAGCGCTCTTAGCAGAGACTGCCATAACATCTGGATATCCCTTCCGCAACCCG
CTGGACTCTATTGGGCCCAAAATTTCCACAGTCCGCTCTCCTTCAAAATCCATTCCAATCCAC
AGCCCTCCGACCAGCAGATGAAGATCATCGAAATCAATTTGGGCAACGAGACCGATCCTCATC
AGCTCCCAATGTGCATATAACACAATAGAACCTGTCAATATTGATGACTTATTAGAGACCAAG
GATTTCTGGTGTGAGGAGTCAACACAGGTTTGTCTGCTACCCCTGCTCATTACCTGGT
CTCACTAACTAAGCGTGAAGCCCTTACAGAAATCCAGGAGCTCAGCGAGAAAGGAATCATCTT
CATCTCAGAAACAGGAAATCGAATGAAACACTTGGTAGACGGACTCGAGTGTATGGGA
GATTCCTGATGGGAGATACAGTGGGAGCAAAATTTGGATCTGGATGATTTGGAAAGCTGTACA
AGGAAAGTGGCATGCTGATGGCACTGAAATGTTGAATGTGACAGCACTACACTGAGCA
GTTCAAGGCTTCAAAATGAAGTAGGAGTACTCAGGAAACAGGACATGTGAATCTCTACTCT
TCATGGGCTATTCCACAAGCCCAACTGGCTATTGTTACCCAGTGGTGTGAGGGCTCCAGCT
GTATGACCATCTCCATATCATTGAGACCAAAATTTGAGATGATGAACTTATAGATATTGACAGACA
GACTGCACAGGGCATGGATTACTTACACGCCAAGTCAATCATCCACAGAGACCTCAAGAGTAA
AATATATTTCTCATGAAGACCTCAGAGTAAAATAGGTGATTTGGTCTAGCTACAGTGAATCT
CGATGGAGTGGGCTCCATCAGTTTGAACAGTTGCTGATCCATTTTGTGGATGGCACCAGAG
TCATGGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAAGTCAAGATGATATGATTTGGAAATGTTT
TGTATGAAATGACTGACGACAGTTACCTTATTCAACATCAACACAGGGGACCAGATAATTTTA
TGGTGGGAGGAGATACCTGTCTCCAGATCTCAGTAAAGTACGGAGTAACTGTCCAAAACCCAT
GAAGATTAATGACAGAGTGCCTCAAAAAGAAAAGATGAGAGACCACTTTCCTCCCAATTC
TGCCCTATTGAGCTGCTGCGCGCTGATTGCCAAAATTCACCGAGTGCATCAGAACCCCTG
CTTGAATCGGGTGGTTTCCAAACAGAGGATTTAGTCTATATGCTTGTGCTTCCAAAACAC
CCATCCAGCAGGGGATATGGTGGCTTCCCTGTCCACTGAAACAAATGAGTGAAGAGATTGAG
GAGAGTAGCAACAAAAGAAAATAAATGAACATATGTTTGTATATGTTAAATGAATAAAATAC
TCTCTTTTTTTAAAGTGAACCAAGAACACTTGTGGTTAAAGACTAGATATAATTTTTCCC
AACTAAAATTTACTTAACTTGAATTTTTAACTCCAAAGGTTAAAATACATAGACATTTGTTAA
AAATTTGGCAGAGCCTCTTAGAGGCTTTAATCTTGTGTTCCGGGTTTTGATGATTCAGTTGGTAT
TTTAAAGTAGTAAACTTCAGTTTCTCATGCACTTTTGTGCCAGCTATGACATGTCCAGTACGGGAC
TCCGAAAGACCCCTACCTATGCTGTGTTTGGAGTGTGAGAGTGTGGAGTCCGTTAGCCTG
GTTAGATAAGGCAACTGAACAGATCTAATTTAGAAAGTCAAGATAATTTAAATTTCTAATAT
TCTTATAATTTTTCTATAACTTTCTTTTTTAAACAATTTGGAAAATGGAATGCTTTTTATTTCC
TTGAAGCAATAAATAAGTTCTTTTTTATAAAAA

```

【図2】

図2：ヒト BRAF ポリペプチド配列 (配列番号2)  
(NCBI 参照配列番号: NP\_004324.2;gi33188459)

```

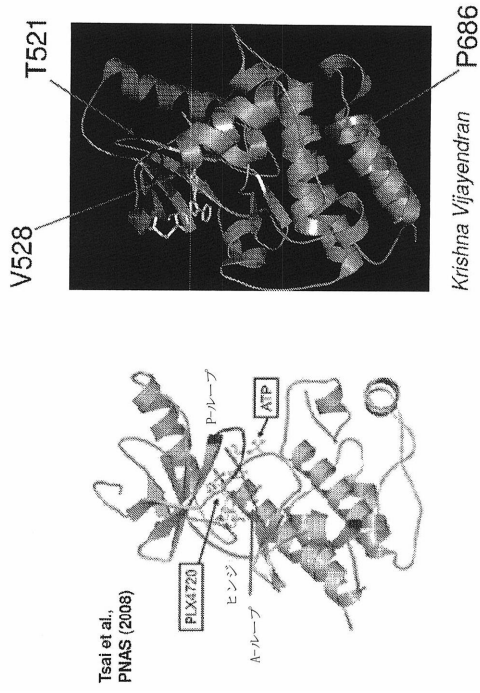
MAALSGGGGGGAEPGQALFNGDMEPEAGAGAGAAAADPAIPEEVWNIKMKILTOEHIEALL
DKFGGEHNPPSIYLEAYEYTSKLDALQQREQLLESLLNGTDFSVSSASMDVTSSSSSSLSV
LPSSLSVFNPTDVARSNPKSPQKIVRVFLPNKQRTVVPARCGVTVRDLSKKALMMRGLIPECC
AVYRIQDGEKKPIGWDTDISWLTGEEHLVLEVLNPLTHNFVRKTFITLAFDCFGRKLLFGFR
QTGQYKHFQRCSDEVPLMCVNYDQLDLLFVSKFFEHHPPEEASLAETALTSGSSSPASDSIG
PQILTSPSPKSIPIQPFPPADEDHRNGFGQRDRSSAPFNWHINTIEPVNIDLRDGGFRDGGG
TTGLSATFPASLPGSLTNKALQKSPQPREKSSSSSEDRNRMKTLGRDSSDWEIPIQDITV
GQRIGSGFTVYKQKWHWDVAVKMLNVTAPTQQLQAFKNEVGLRKRTRHVNILFMGYSTKP
QLAIVTQWCEGSSLYHLLHIETKFKEMIKLIDARQTAQGDYDLHAKSIHRDLKSNIFLHEDLTKVIG
DFGLATVKSRLWGGSHQFELSGSILWMAFEVIRMQDKNPSYFQSDVYAFVIVLYELMTGQLPYSN
INNRDQIIFMVGRGYLSPDLKVRNSCPKMKRMLMAECLKKRDERLFPQILASIELLARSLPKIHR
SASEPFLNRAGFQTEDFSLYACASPKTPIQAGGYGAFVH

```



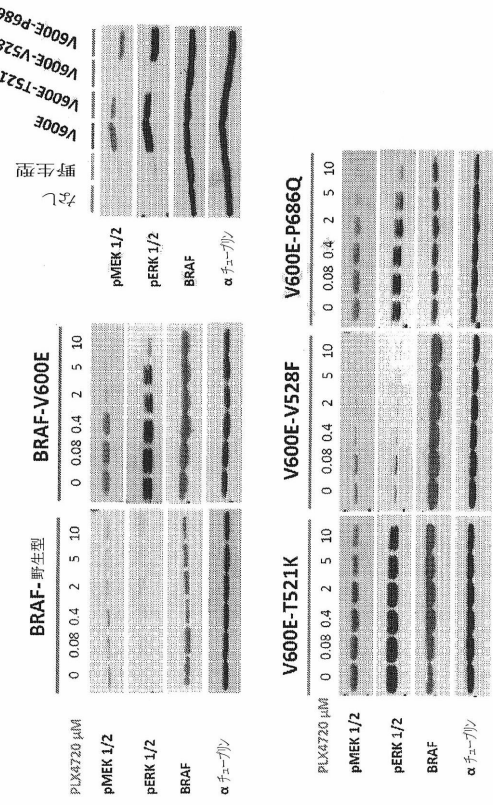
【 図 7 】

図7：RAF205 と PLX4720 両方のスクリーニングに共通する BRAF 突然変異



【 図 8 】

図8：PLX4720濃度を増加させながら処理した BRAF、p-MEK1/2 および p-ERK1/2 レベルの免疫プロット実験



【 配列表 】

0005933459000001 . app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02 C
C 1 2 Q	1/48	(2006.01)	C 1 2 Q	1/48 Z
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50 Z
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574 Z
C 1 2 N	9/12	(2006.01)	C 1 2 N	9/12

(74)代理人 100135415

弁理士 中濱 明子

(72)発明者 ギャラウェイ, レヴィ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02460-1945, ニュートン, ウォルナット・ストリート, 363

(72)発明者 エメリー, キャロライン

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02446-2807, ブルックライン, ナンバー9, ビーコン・ストリート 1382

審査官 山本 晋也

(56)参考文献 国際公開第2010/007030(WO, A1)

国際公開第2008/125820(WO, A1)

国際公開第2008/079903(WO, A1)

HEIDORN SONJA J. et al, KINASE-DEAD BRAF AND ONCOGENIC RAS COOPERATE TO DRIVE TUMOR PROGRESSION THROUGH CRAF, CELL, 2010年1月22日, Vol. 140, No. 2, p. 209-221

WHITTAKER STEVEN et al, GATEKEEPER MUTATIONS MEDIATE RESISTANCE TO BRAF-TARGETED THERAPIES, SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, 2010年6月9日, Vol. 2, No. 35, 35RA41, p. 1-10

ROSKOSKI ROBERT JR., RAF PROTEIN-SERINE/THREONINE KINASES: STRUCTURE AND REGULATION, BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, 2010年7月30日, Vol. 399, No. 3, p. 313-317

Emery et al, PNAS, 2009年12月1日, Vol. 106, No. 48, p. 20411-20416

Emery et al, PNAS, 2009年12月1日, Vol. 106, No. 48, p. 20411-204116

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

A 6 1 K

G 0 1 N

EMBASE / BIOSIS (STN)

UniProt / GeneSeq

专利名称(译)	BRAF突变赋予对BRAF抑制剂的抗性		
公开(公告)号	<a href="#">JP5933459B2</a>	公开(公告)日	2016-06-08
申请号	JP2012555071	申请日	2011-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司		
[标]发明人	ギャラウェイレヴィ エメリーキャロライン		
发明人	ギャラウェイ,レヴィ エメリー,キャロライン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C12Q1/48 G01N33/50 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/574 C12N9/12		
CPC分类号	A61K31/4184 A61K31/437 A61K31/4439 A61K31/5377 A61P13/00 A61P15/00 A61P17/00 A61P19/00 A61P21/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P43/00 C12N9/12 C12Q1/485 C12Q1 /6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 G01N33/5011 G01N2333/912 G01N2500/02 A61K31/7088 C12N15/11 C12N15/63 C12Y207/11001 G01N33/573 G01N33/68		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/19 C12N1/15 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02.C C12Q1/48.Z G01N33/50.Z G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/574.Z C12N9/12		
代理人(译)	小林 泰 星野 修 中滨 明子		
审查员(译)	山本晋也		
优先权	61/308275 2010-02-25 US		
其他公开文献	JP2013527747A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 本发明涉及涉及用抗癌剂，特别是BRAF抑制剂治疗的抗性的方法，组合物和试剂盒。在具体的实施方案中，本发明涉及赋予对BRAF抑制剂的抗性的BRAF序列中的突变。鉴定BRAF序列中的此类突变允许鉴定和设计第二代BRAF抑制剂。还提供了用于检测样品中突变BRAF序列的存在的方法和试剂盒。	(21) 出願番号	特願2012-555071 (P2012-555071)	(73) 特許権者	399052796
	(86) (22) 出願日	平成23年2月22日 (2011. 2. 22)	ダイナ ファーバー キャンサー インス	
	(65) 公表番号	特表2013-527747 (P2013-527747A)	ティチュート, インコーポレイテッド	
	(43) 公表日	平成25年7月4日 (2013. 7. 4)	アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02	
	(86) 国際出願番号	PCT/US2011/025645	215, ボストン, ブルックライン ア	
	(87) 国際公開番号	W02011/106298	ベニュー 450	
	(87) 国際公開日	平成23年9月1日 (2011. 9. 1)	(74) 代理人	100140109
	審査請求日	平成26年2月10日 (2014. 2. 10)	弁理士	小野 新次郎
	(31) 優先権主張番号	61/308, 275	(74) 代理人	100075270
	(32) 優先日	平成22年2月25日 (2010. 2. 25)	弁理士	小林 泰
	(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100096013
			弁理士	富田 博行
			(74) 代理人	100092967
		弁理士	星野 修	