

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6210977号
(P6210977)

(45) 発行日 平成29年10月11日(2017.10.11)

(24) 登録日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533
GO 1 N 33/535 (2006.01)	GO 1 N 33/535
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M
請求項の数 25 (全 80 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2014-512072 (P2014-512072)	(73) 特許権者	501087490
(86) (22) 出願日	平成24年5月23日(2012.5.23)		セル・シグナリング・テクノロジー・インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2014-517297 (P2014-517297A)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 1 9 2 3 ダンヴァース トラスク・レーン 3
(43) 公表日	平成26年7月17日(2014.7.17)	(74) 代理人	100127926
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/039108		弁理士 結田 純次
(87) 国際公開番号	W02012/162373	(74) 代理人	100140132
(87) 国際公開日	平成24年11月29日(2012.11.29)		弁理士 竹林 則幸
審査請求日	平成27年5月14日(2015.5.14)	(72) 発明者	ヴィクトリア・マクギネス・リムクナス
(31) 優先権主張番号	13/113,676		アメリカ合衆国マサチューセッツ州O 1 8 6 7. リーディング・グローヴストリート 5 7
(32) 優先日	平成23年5月23日(2011.5.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 肺癌におけるROSキナーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中のFIG-ROS融合ポリペプチドの存在を検出する方法であって、

前記ポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの試薬を利用して、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程；
を含み、ここで前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、
上記方法。

【請求項2】

前記生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、腫瘍摘出、微細針吸引または胸水貯留から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記哺乳動物肺癌はヒト肺癌である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記FIG-ROS融合ポリペプチドは、FIG-ROS(S)ポリペプチド(配列番号：58)、FIG-ROS(L)ポリペプチド(配列番号：56)およびFIG-ROS(VL)ポリペプチド(配列番号：60)からなる群から選択されるポリペプチドに対し95%同一である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記試薬は抗体である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

フロー・サイトメトリー・アッセイ、免疫組織化学 (I H C) アッセイ、免疫蛍光 (I F) アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) アッセイおよびウエスタン・プロット分析アッセイからなる群から選択される形式で実行される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中の F I G - R O S 融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出する方法であって、

前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬を利用して、前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程；
を含み、ここで前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、

上記方法。

【請求項 8】

前記生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、腫瘍摘出、微細針吸引または胸水貯留から選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記哺乳動物肺癌はヒト肺癌である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 F I G - R O S 融合ポリペプチドは、F I G - R O S (S) ポリペプチド (配列番号：58)、F I G - R O S (L) ポリペプチド (配列番号：56) および F I G - R O S (V L) ポリペプチド (配列番号：60) からなる群から選択されるポリペプチドに対し 95 % 同一である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ポリヌクレオチドは、配列番号：57、配列番号：55、配列番号：59 からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試薬は核酸プローブである、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 13】

前記核酸プローブは蛍光 *in-situ* ハイブリダイゼーション (F I S H) プローブであり、前記方法は F I S H アッセイで実行される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記試薬はポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) プライマー対を含み、前記方法は P C R アッセイで実行される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 15】

前記試薬は検出可能に標識される、請求項 1 または 7 に記載の方法。

【請求項 16】

肺癌における F I G - R O S 融合ポリペプチドの発現および / または活性を阻害する工程を含む、前記ポリペプチドを発現する前記癌の進行を阻害する方法において使用するための薬剤の調製における物質の使用。

【請求項 17】

肺癌における F I G - R O S 融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの発現を阻害する工程を含む、前記ポリヌクレオチドを含む前記癌の進行を阻害する方法において使用するための薬剤の調製における物質の使用。

【請求項 18】

前記哺乳動物肺癌はヒト由来である、請求項 16 または 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記物質は、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、N V T T A E - 6 8 4 および A P 2 6 1 1 3 からなる群から選択される治療剤である、請求項 16 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 20】

肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者において R O S 阻害性治療剤に
応答する可能性を予測する方法であって、

前記患者の肺由来の生物学的サンプルを、 F I G - R O S 融合ポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させる工程、

その試薬が生物学的サンプルに特異的に結合するか否かを検出する工程；
を含み、ここで生物学的サンプルに対するその試薬の結合の検出が、 R O S 阻害性治療剤に
応答する可能性が高い患者であることを示す、
方法。

【請求項 21】

前記生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、腫瘍摘出、微細針吸引または胸水貯留から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記 R O S 阻害性治療剤は、 P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、 N V T T A E - 6 8 4 または A P 2 6 1 1 3 である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者由来の生物学的サンプル中の F I G - R O S 融合ポリペプチドの存在を検出する工程、および有効量の薬剤をその患者に投与する工程を含む、肺癌の患者を処置する方法において使用するための薬剤の調製における R O S 阻害性治療剤の使用。

【請求項 24】

前記生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、腫瘍摘出、微細針吸引または胸水貯留から選択される、請求項 23 に記載の使用。

【請求項 25】

前記治療剤は、 P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、 N V T T A E - 6 8 4 または A P 2 6 1 1 3 である、請求項 23 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肺癌（例えばヒト肺癌）に關与するタンパク質および遺伝子、ならびに肺癌の検出、診断および処置に一般に關する。

【背景技術】

【0002】

多くの癌は、成長および増殖を含む細胞プロセスの異常な制御を導く、細胞シグナル伝達経路における破壊を特徴とする。これらの破壊は、特定のシグナル伝達タンパク質、例えばキナーゼの活性における変化によって引き起こされる場合が多い。

【0003】

プロテイン・キナーゼ・タンパク質の異常な発現は、癌の原因因子（およびその駆動体）であり得る。異常な発現は、タンパク質（またはそのキナーゼ部分）と二次タンパク質（またはその部分）との融合、タンパク質の切断型部分の発現、または全長タンパク質の発現の異常な調節によって、引き起こされ得る。

【0004】

異常なシグナル伝達活性を有するキナーゼ融合タンパク質を生じる遺伝子転座は、特定の癌を直接的に導き得ることが公知である（例えば、非特許文献 1、非特許文献 2 および非特許文献 3 を参照のこと）。例えば、 B C R - A B L 癌タンパク質、チロシン・キナーゼ融合タンパク質は、原因因子であり、ヒト慢性骨髄性白血病（ C M L ）を駆動する。 C M L 症例の少なくとも 90 ~ 95 % において見出される B C R - A B L 癌タンパク質は、第 9 染色体上の c - A B L プロテイン・チロシン・キナーゼ由来の遺伝子配列の、第 2 2 染色体上の B C R 配列中への転座によって生成され、いわゆるフィラデルフィア染色体を生じる。例えば、非特許文献 4 を参照のこと。転座は、急性リンパ性白血病（ A L L ）お

10

20

30

40

50

よび急性骨髄性白血病（AML）の症例においても観察される。これらの発見は、CMLおよびALLの処置のための、ABLキナーゼの小分子インヒビター、メシル酸イマチニブ（Novartisにより商標Gleevec（登録商標）の下で販売される）およびダサチニブ（Bristol-Myers Squibbにより商標Sprycel（登録商標）の下で販売される）のFDA承認に拍車をかけた。これらの薬物は、腫瘍細胞の成長を駆動するシグナル伝達経路を妨害するために設計された薬物の例である。かかる薬物の開発は、周知の副作用に苦しめられ、癌の根本原因を特異的に標的化することができないためにしばしば効果が限定的である、CMLおよびALLに対する従来の治療剤、化学療法ならびに放射線を越えた顕著な利点を示す。

【0005】

10

従って、癌が治療に応答する可能性がより高い場合に、癌を初期段階で検出するために、癌を駆動するタンパク質を同定することが有用である。さらに、かかるタンパク質の同定は、とりわけ、標的化された治療のために患者を選択するため、ならびにかかるタンパク質を阻害する、従って癌を処置する新規薬物のスクリーニングおよび開発のための新規方法を可能にすることが望ましい。

【0006】

レセプター・チロシン・キナーゼ（RTK）の発癌性の役割は、肺癌を含む多くの型の固形腫瘍に關与している。非小細胞肺癌および小細胞肺癌を含むいくつかのサブタイプを有する肺癌は、世界中の男性および女性の両方において、癌に起因する死亡の最も一般的な原因である。U.S. National Cancer Instituteによれば、米国における14人の男性および女性のうちおよそ1人が、生涯におけるいくつかの時点で肺の癌を有すると診断されることになる。肺癌の2つの特に致命的な形態は、小細胞肺癌腫（SCLC）および非小細胞肺癌腫である。

20

【0007】

残念なことに、肺癌は、初期段階で診断されない場合が多く、化学療法または放射線療法と併用した場合でさえ、手術に完全に応答しない場合が多い。例えば、NSCLCは、米国における癌死亡の主要原因であり、全ての肺癌の約87%を占める。米国では毎年約151,000のNSCLCの新規症例が存在し、120,000人を超える患者が、米国単独において毎年この疾患により死亡するであろうと推定される。非特許文献5を参照のこと。3つの別個のサブタイプを含むNSCLCは、転移した後になってやっと検出される場合が多く、従って、死亡率は診断の2年以内に75%である。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Mitelmanら、Nature Reviews Cancer 7巻：233～245頁、2007年

【非特許文献2】Futrealら、Nat Rev Cancer 4巻（3号）：177～183頁（2004年）

【非特許文献3】Faliniら、Blood 99巻（2号）：409～426頁（2002年）

40

【非特許文献4】Kurzockら、N. Engl. J. Med. 319巻：990～998頁（1988年）

【非特許文献5】「Cancer Facts and Figures 2005」、American Cancer Society

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、初期段階で肺癌を同定する新規方法、および肺癌を処置するための新規方法（および新規試薬）を発見することは、有用である。

【課題を解決するための手段】

50

【0010】

本発明は、癌、特に肺癌における異常なROS発現および/または活性の発見に基づいている。健康で正常な肺の組織および細胞は、ROSキナーゼ・タンパク質もROSキナーゼ活性も発現しないので、哺乳動物肺癌におけるROSの異常な発現は、例えば、哺乳動物肺癌における全長ROSキナーゼの発現に起因し得る。哺乳動物肺癌におけるROSの異常な発現は、切断型ROS（例えば、キナーゼ・ドメインを含むROSキナーゼの一部を含む）、または本明細書中に開示されるROS融合タンパク質のうち1つのいずれかの存在にも、起因し得る。肺癌におけるROSの全ての開示された発現は、ROSキナーゼ・ドメインの発現を生じる；従って、全ての開示されたROS融合ポリペプチドは、アクティブなROSキナーゼ活性を有する。

10

【0011】

従って、第1の態様において、本発明は、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌から生物学的サンプルを得る工程；および前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの試薬を利用して、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程。

【0012】

別の実施形態において、試薬は抗体である。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、検出可能に標識される。別の実施形態において、試薬は、全長ROSポリペプチドに特異的に結合する。別の実施形態において、試薬は、ROSキナーゼ・ドメインに特異的に結合する。別の実施形態において、試薬は、ROS融合ポリペプチドに特異的に結合する（例えば、CD74-ROS融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(S)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(L)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(VS)ポリペプチド、FIG-ROS(L)ポリペプチド、FIG-ROS(S)ポリペプチドまたはFIG-ROS(VL)ポリペプチドに特異的に結合する）。

20

【0013】

本発明の方法の種々の実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドは、全長ROSポリペプチドである。別の実施形態において、ポリペプチドは、ROS融合ポリペプチドである。別の実施形態において、ROS融合ポリペプチドは、CD74-ROS融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(S)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(L)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(VS)ポリペプチド、FIG-ROS(L)ポリペプチド、FIG-ROS(S)ポリペプチドおよびFIG-ROS(VL)ポリペプチドからなる群から選択される。種々の実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号：1、配列番号：61、配列番号：58、配列番号：56、配列番号：60、配列番号：28、配列番号：7、配列番号：5または配列番号：22のアミノ酸配列を含む。

30

【0014】

いくつかの実施形態において、この方法は、フロー・サイトメトリー・アッセイ、*in vitro*キナーゼ・アッセイ、免疫組織化学(IHC)アッセイ、免疫蛍光(IF)アッセイ、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)アッセイおよびウエスタン・ブロッティング分析アッセイからなる群から選択される形式で実施される。

40

【0015】

一実施形態において、前記ポリペプチドのキナーゼ活性が検出される。別の実施形態において、試薬は、重同位体標識された(AQUA)ペプチドである。別の実施形態において、重同位体標識された(AQUA)ペプチドは、ROS融合ポリペプチドの融合接合部を含むアミノ酸配列を含む。別の実施形態において、この方法は、質量分析を使用して実施される。

【0016】

50

別の態様において、本発明は、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：(a)哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌から生物学的サンプルを得る工程、および(b)前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬を利用して、前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程。

【0017】

10

いくつかの実施形態において、このポリヌクレオチドは、配列番号：2、6、8、23、29、55、57および59からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態において、試薬は核酸プローブである。いくつかの実施形態において、試薬は検出可能に標識される。別の実施形態において、核酸プローブは、蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)プローブであり、前記方法は、FISHアッセイで実施される。別の実施形態において、核酸プローブは、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)プローブであり、前記方法は、PCRアッセイで実施される。さらなる実施形態において、試薬は検出可能に標識される。

【0019】

20

本発明の方法の種々の実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドは、全長ROSポリペプチドである。別の実施形態において、このポリペプチドは、ROS融合ポリペプチドである。別の実施形態において、このROS融合ポリペプチドは、CD74-ROS融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(S)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(L)ポリペプチド、SLC34A2-ROS(VS)ポリペプチド、FIG-ROS(L)ポリペプチド、FIG-ROS(S)ポリペプチドおよびFIG-ROS(VL)ポリペプチドからなる群から選択される。種々の実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドは、配列番号：1、配列番号：61、配列番号：58、配列番号：56、配列番号：60、配列番号：28、配列番号：7、配列番号：5または配列番号：22のアミノ酸配列を含む。

30

【0020】

本発明の方法の種々の実施形態において、肺癌は、ヒト肺癌(例えば、非小細胞肺癌腫または小細胞肺癌腫)である。さらなる実施形態において、生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、腫瘍摘出、微細針吸引、胸水貯留および循環腫瘍細胞からなる群から選択される。

【0021】

本発明の方法の種々の実施形態において、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌は、非小細胞肺癌腫である。種々の実施形態において、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌は、ヒト由来である。

【0022】

40

本発明の方法の種々の実施形態において、生物学的サンプルは、ROSキナーゼ活性によって駆動される哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来であると診断される。いくつかの実施形態において、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌は、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い。種々の実施形態において、前記生物学的サンプルが得られる患者は、試薬が生物学的サンプルに特異的に結合する場合、ROSキナーゼ活性によって駆動される哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌を有すると診断される。いくつかの実施形態において、患者は、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高いと診断される。ROS阻害性治療剤の1つの非限定的な例は、クリゾチニブ(PF-02341066としても公知)である。ROS阻害性治療剤のさらなる非限定的な例には、NVT TAE-684、AP26113、CEP-14083、CEP-14513、CH542

50

4802、CEP11988、WHI-P131およびWHI-P154が含まれる。

【0023】

別の態様において、本発明は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドを発現する哺乳動物癌または疑われる哺乳動物癌の進行を阻害する方法を提供し、前記方法は、前記哺乳動物癌または疑われる哺乳動物癌における前記ポリペプチドの発現および/または活性を阻害する工程を含む。

【0024】

別の態様において、本発明は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む哺乳動物癌または疑われる哺乳動物癌の進行を阻害する方法を提供し、前記方法は、前記哺乳動物癌または疑われる哺乳動物癌における前記ポリヌクレオチドの発現を阻害する工程を含む。

10

【0025】

種々の実施形態において、肺癌または疑われる肺癌は、ヒト由来である。いくつかの実施形態において、このポリペプチドまたはポリヌクレオチドの発現および/または活性は、PF-02341066、NVT TAE-684、AP26113、CEP-14083、CEP-14513、CEP11988、CH5424802、WHI-P131およびWHI-P154からなる群から選択されるROS阻害性治療剤によって阻害される。

【0026】

なお別の態様において、本発明は、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として、肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者を同定する方法を提供し、この方法は以下を含む：前記患者の肺由来の生物学的サンプルを、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させる工程、生物学的サンプルに対するその試薬の結合の検出が、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として患者を同定する、その試薬が生物学的サンプルに特異的に結合するか否かを検出する工程。

20

【0027】

なお別の態様において、本発明は、肺癌について患者を処置する方法を提供し、この方法は以下を含む：肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者の肺由来の生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの存在を検出する工程；および治療有効量のROS阻害性治療剤を患者に投与し、それにより肺癌について被験体を処置する工程。

30

【0028】

なお別の態様において、本発明は、肺癌について患者を処置する方法を提供し、この方法は以下を含む：肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者の肺由来の生物学的サンプル中の、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドおよびALKキナーゼ活性を有するポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの存在を検出する工程；および治療有効量のALK/ROS阻害性治療剤を患者に投与し、それにより肺癌について被験体を処置する工程。

【0029】

さらなる態様において、本発明は、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として、肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者を同定する方法を提供し、この方法は以下を含む：前記患者の肺由来の生物学的サンプルを、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第1の試薬およびALKキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第2の試薬と接触させる工程、ならびに生物学的サンプルに対する第1の試薬または第2の試薬のいずれかの結合の検出が、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として患者を同定する、第1の試薬または第2の試薬が生物学的サンプルに特異的に結合するか否かを検出する工程。

40

【0030】

さらなる態様において、本発明は、ALK阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として、肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者を同定する方法を提供し、こ

50

の方法は以下を含む：前記患者の肺由来の生物学的サンプルを、R O Sキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第1の試薬およびA L Kキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第2の試薬と接触させる工程、ならびに生物学的サンプルに対する第1の試薬または第2の試薬のいずれかの結合の検出が、A L K阻害性治療剤に反応する可能性が高い患者として患者を同定する、第1の試薬または第2の試薬が生物学的サンプルに特異的に結合するか否かを検出する工程。

【0031】

種々の実施形態において、第1の試薬は、全長R O Sキナーゼ・タンパク質に特異的に結合する。種々の実施形態において、第2の試薬は、全長A L Kキナーゼ・タンパク質に特異的に結合する。種々の実施形態において、第1の試薬は、R O Sキナーゼ・タンパク質のキナーゼ・ドメインに特異的に結合する。種々の実施形態において、第2の試薬は、A L Kキナーゼ・タンパク質のキナーゼ・ドメインに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、第1の試薬は抗体である。いくつかの実施形態において、第2の試薬は抗体である。

10

【0032】

本発明の全ての態様の種々の実施形態において、患者はヒト患者であり、肺癌（または疑われる肺癌）はヒト由来である。いくつかの実施形態において、肺癌は、N S C L CまたはS C L Cである。いくつかの実施形態において、R O S阻害性治療剤またはA L K阻害性治療剤は、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、N V T T A E - 6 8 4またはA P 2 6 1 1 3である。いくつかの実施形態において、R O S阻害性治療剤またはA L K阻害性治療剤は、A P 2 6 1 1 3、C E P - 1 4 0 8 3、C E P - 1 4 5 1 3、C E P 1 1 9 8 8、C H 5 4 2 4 8 0 2、W H I - P 1 3 1およびW H I - P 1 5 4である。

20

【0033】

種々の実施形態において、生物学的サンプルは、肺生検、気管支肺胞洗浄、循環腫瘍細胞、腫瘍摘出、微細針吸引および胸水貯留からなる群から選択される。

【0034】

さらなる態様において、本発明は、化合物が、R O S活性を有するポリペプチドの発現を特徴とする哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌の進行を阻害するか否かを決定する方法を提供し、前記方法は、前記化合物が、前記癌における前記ポリペプチドの発現を阻害するか否かを決定する工程を含む。別の態様において、本発明は、R O S活性を有するポリペプチドの発現を特徴とする哺乳動物癌または疑われる哺乳動物癌の進行を阻害する方法を提供し、前記方法は、前記哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌において前記ポリペプチドの発現および/または活性を阻害する工程を含む。いくつかの実施形態において、癌はヒト由来である。

30

【0035】

この特許または出願のファイルは、カラーで作成された図面を含む。カラー図面を有するこの特許または特許出願の公報のコピーは、請求および必要な手数料の支払いに応じて、庁によって提供されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図1】全長/野生型R O Sよりもかなり小さい分子量を有するR O Sの形態の発現を示す、ヒトN S C L C細胞株（H C C 7 8）由来の抽出物のウエスタン・プロット分析を示す図である。

40

【図2】ヒトN S C L C細胞株における変異体R O Sキナーゼのs i R N A阻害を示す図である：パネルAは、s i R N Aトランスフェクション後の細胞阻害のグラフを示し、パネルBは、R O Sの特異的ノック・ダウンおよび増加したアポトーシス（変異体R O S駆動細胞株中）を示すイムノプロットであり、パネルCは、R O Sの下流のシグナル伝達分子の減少した活性を示すイムノプロットである。

【図3A】それぞれ染色体4 pおよび6 q上のS L C 3 4 A 2遺伝子およびR O S遺伝子の位置を示す図である。

50

【図3B】全長SLC34A2タンパク質およびROSタンパク質のドメイン位置を示す図である。

【図3C】長いSCL34A2-ROSバリエントを示す模式図であり、SCL34A2のエキソン1~4を、ROSのエキソン32~43と組み合わせている。融合接合部は、ROSの膜貫通ドメインの上流の残基1750に存在し、融合接合部に隣接するヌクレオチドおよびアミノ酸残基(それぞれ、配列番号:12および配列番号:13)は、図3Cの下に示される(SCL34A2由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は標準のフォントであり、ROS由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は太字である)。

【図3D】短いSCL34A2-ROSバリエントを示す模式図であり、SCL34A2のエキソン1~4を、ROSのエキソン32~43と組み合わせている。融合接合部は、ROSの膜貫通ドメインの直ぐ上流の残基1853に存在し、融合接合部に隣接するヌクレオチドおよびアミノ酸残基(それぞれ、配列番号:14および配列番号:15)は、図3Dの下に示される(SCL34A2由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は標準のフォントであり、ROS由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は太字である)。

【図3E】予測された非常に短いSCL34A2-ROSバリエントを示す模式図であり、SCL34A2のエキソン1~4を、ROSのエキソン35~43と組み合わせている。融合接合部は、ROSの膜貫通ドメインのN末端境界において、ROSの残基1882に存在すると予測され、融合接合部に隣接するヌクレオチドおよびアミノ酸残基(それぞれ、配列番号:16および配列番号:17)は、図3Eの下に示される(SCL34A2由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は標準のフォントであり、ROS由来のヌクレオチドおよびアミノ酸残基は太字である)。

【図4A】ヒトSLC34A2-ROS融合タンパク質の長いバリエントのアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:5)(上のパネル)を示す図であり、コードするDNA配列もまた示されている(配列番号:6)(下のパネル);SLC34A2部分の残基はイタリックであり、ROSのキナーゼ・ドメインの残基は太字である。

【図4B】ヒトSLC34A2-ROS融合タンパク質の短いバリエントのアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:7)(上のパネル)を示す図であり、コードするDNA配列もまた示されている(配列番号:8)(下のパネル);SLC34A2部分の残基はイタリックであり、ROSのキナーゼ・ドメインの残基は太字である。

【図5】ヒトSLC34A2タンパク質のアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:3)(SwissProtアクセッション番号095436)(上のパネル)を示す図であり、コードするDNA配列もまた示されている(配列番号:4)(GeneBankアクセッション番号NM_006424)(下のパネル);転座に關与する残基に下線を付している。

【図6A】ヒトROSキナーゼのアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:1)(SwissProtアクセッション番号P08922)を示す図であり;SLC34A2-ROS(長い)バリエント転座に關与する残基に下線を付しており、下線付きの太字の残基は、(短い)バリエント転座に關与する残基であり、下線付きの太字の赤色残基は、予測された(非常に短い)バリエント転座に關与する残基である。

【図6B-1】ヒトROSキナーゼのコードするDNA配列(配列番号:2)(GeneBankアクセッション番号NM_002944)を示す図であり;第1のSLC34A2-ROS(長い)バリエント転座に關与する残基に下線を付しており、下線付きの太字の残基は、第2の(短い)バリエント転座に關与する残基であり、下線付きの太字の大文字残基は、(非常に短い)バリエント転座に關与する残基である。

【図6B-2】図6B-1の続き。

【図7】コントロール(レーン1および2)と比較した、トランスフェクトされた293細胞(ヒト胚腎臓)におけるSLC34A2-ROS融合タンパク質(第1の(長い)バリエント)の発現を示すゲルを示す図である。

【図8】それぞれ染色体5qおよび6q上のCD74遺伝子およびROS遺伝子の位置(パネルA)、ならびに全長CD74タンパク質およびROSタンパク質のドメイン位置な

10

20

30

40

50

らびにCD74-ROS融合タンパク質中のドメイン位置(パネルBおよびC(配列番号:30はパネルCの下に示される))を示す図である。融合接合部は、ROSの膜貫通ドメインの上流の残基1853に存在する。

【図9-1】ヒトCD74-ROS融合タンパク質のアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:22)(上のパネル)を示す図であり、コードするDNA配列もまた示されている(配列番号:23)(下のパネル);CD74部分の残基には下線を付しており、ROSのキナーゼ・ドメインの残基は太字である。

【図9-2】図9-1の続き。

【図10】ヒトCD74タンパク質のアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:24)(SwissProtアクセッション番号P04233)(上のパネル)を示す図であり、コードするDNA配列もまた示されている(配列番号:25)(GeneBankアクセッション番号NM_001025159)(下のパネル);転座に關与する残基に下線を付している。

10

【図11A】ヒトROSキナーゼのアミノ酸配列(1文字コード)(配列番号:1)(SwissProtアクセッション番号P08922)を示す図であり;CD74-ROS転座に關与する残基に下線を付している。

【図11B-1】ヒトROSキナーゼのコードするDNA配列(配列番号:2)(GeneBankアクセッション番号NM_002944)を示す図であり;CD74-ROS転座に關与する残基に下線を付している。

【図11B-2】図11B-1の続き。

20

【図12】RT-PCRによる、CD74およびROSの転座によって形成された融合遺伝子の検出を示すゲルを示す図である;CD74-F1(上)およびROS-GSP3(下)に対するプライマー配列が示されている(それぞれ、配列番号:26および27)。

【図13】A~Fは、非小細胞肺癌(NSCLC)FFPE腫瘍組織における、ROSTタンパク質の免疫組織化学およびROS核酸のFISHを示す写真を示す図である。ROSTタンパク質の局在におけるバリエーションは、以下のように示される:(A)細胞質に拡散、挿入図(A)中の黄色矢印は、FISHによるc-ros遺伝子座の平衡転座を示す。(B)腺癌におけるROSの強い点状局在であり、ズーム(即ち拡大画像)は挿入図中にある。(C)大細胞癌腫におけるROS染色の細胞質局在ならびにパネルEにおける対応するヘマトキシリンおよびエオシン染色。(D)独自の細胞質染色および膜局在を有する腺癌、挿入図中のズームは、膜染色を示す。(E)パネルCのROS染色に対応するヘマトキシリンおよびエオシン染色。(F)点状小胞染色、挿入図中のズームは、小胞染色を示す。

30

【図14】A~Bは、2色ブレイク-ア-パート(break-a-part)プローブを使用するFISHによる、ROS融合/転座の特異的検出(ヒトNSCLC細胞株における)を示す図である。図14Aは、FISHプローブがハイブリダイズするROS遺伝子上の位置を示し、図14Bは、別個のオレンジ色および緑色のシグナルを生じる、ヒトNSCLC細胞株(左)およびヒトNSCLC腫瘍におけるROS遺伝子の再編成を示す。

【図15】2つのプローブ・セットのDNAプローブがROS遺伝子およびFIG遺伝子にハイブリダイズすることを示す模式図である。両方のプローブ・セットの近位プローブ、即ちRP1-179P9はオレンジ色のシグナルを生じるが、3つの遠位プローブは全て、緑色のシグナルを生じる。プローブ・セット1は、c-ros由来であり、平衡転座が存在する場合、オレンジ色は緑色から分離される;しかし、FIG-ROS転座が存在する場合、緑色のシグナルは消失する。プローブ・セット2は、c-ros(オレンジ色RP1-179P9)およびfig(緑色RP11-213A17)由来であった。

40

【図16】A~Fは、HCC78細胞(パネルAおよびB)、U118MG細胞(パネルCおよびD)およびFFPE腫瘍ID749(パネルEおよびF)のFISH分析の結果を示す写真を示す図である。プローブ・セット1(A)およびプローブ・セット2(B)で精査したHCC78細胞は、これらの細胞中に存在するSLC34A2-ROS融合物

50

から予測された結果を示す。黄色の矢印は、HCC78細胞における平衡転座を示すスプリット・シグナル(split signal)を指し、白色の矢印は、インタクトな染色体を指す。プローブ・セット1(C)およびプローブ・セット2(D)で精査したU118MG細胞は、これらの細胞中に存在するFIG-ROS融合物から予測された結果を示す。プローブ・セット1(E)およびプローブ・セット2(F)で精査したFFPE腫瘍749は、U118MG細胞と同一である。プローブ・セット1で精査したU-118MGおよび腫瘍ID749の両方において、c-ros(オレンジ色)プローブだけがアニールし、欠失領域(緑色プローブ)は存在しない(それぞれ、パネルCおよびE)。プローブ・セット2で精査したU-118MGおよび腫瘍ID749(それぞれ、パネルEおよびF)において、c-ros(オレンジ色)プローブおよびfig(緑色)プローブは一緒になって、fig-ros融合物を示す。

10

【図17】腫瘍749由来のROS融合タンパク質のcDNA配列決定の結果(「subject」のライン)およびFIG-ROS(S)ヌクレオチド配列とのそのアラインメント(「query」として)を示す図である。

【図18】FIG-ROS(S)を発現するBaF3(赤色四角)、FIG-ROS(L)を発現するBaF3(青色菱形)、FLT3ITDを発現するBaF3(緑色三角)およびKarpas 299細胞(紫色×字)の、0nM、3nM、10nM、30nM、100nM、300nMまたは1000nMのTAE-684の存在下での細胞成長応答を示す折れ線グラフを示す図である。

【図19】FIG-ROS(S)またはFIG-ROS(L)のいずれかを発現するBaF3が、TAE-684の存在下で、アポトーシスによって死ぬことを示す棒グラフを示す図である。

20

【図20】FIG-ROS(S)およびFIG-ROS(L)の両方のリン酸化を示すウエスタン・ブロッティング分析の描写を示す図であり、その下流のシグナル伝達分子はTAE-684によって阻害される。

【図21A】neo-myc(陰性コントロール;青色菱形);FIG-ROS(S)を発現するBaF3(紫色×字)、FIG-ROS(L)を発現するBaF3(緑色三角)、FLT3ITDを発現するBaF3(赤色四角)およびKarpas 299細胞(青色星印)で形質導入したBaF3細胞の、0uM、0.01uM、0.03uM、0.10uM、0.3uM、1.0uMのTAE-684の存在下での細胞成長応答を示す折れ線

30

【図21B】neo-myc(陰性コントロール;青色菱形);FIG-ROS(S)を発現するBaF3(紫色×字)、FIG-ROS(L)を発現するBaF3(緑色三角)、FLT3ITDを発現するBaF3(赤色四角)およびKarpas 299細胞(青色星印)で形質導入したBaF3細胞の、0uM、0.01uM、0.03uM、0.10uM、0.3uM、1.0uMのクリゾチニブの存在下での細胞成長応答を示す折れ線

【図22】FIG-ROS(S)およびFIG-ROS(L)の両方のリン酸化を示すウエスタン・ブロッティング分析の描写を示す図であり、ALKおよびさらなるシグナル伝達分子が、クリゾチニブによって阻害される。

40

【発明を実施するための形態】

【0037】

本発明は、ヒト肺癌における異常なROSキナーゼ発現の発見に基づいている。ROSキナーゼは、正常な肺の組織でも細胞でも発現されないため、異常なROSキナーゼ活性は、ROSキナーゼが発現される肺癌の増殖および生存を駆動すると予測される。かかる癌は、本明細書中に提供される教示に従って同定(例えば診断)および/または処置され得る。

【0038】

これらの発見に基づいて、その肺癌(または疑われる肺癌)がROS活性を有するタンパク質(例えば、全長ROSタンパク質またはROS融合タンパク質)を発現する患者は

50

、健康な患者の肺組織がかかるROS活性を有するタンパク質を発現しない場合、ROSインヒビターの投与に対して好ましい応答をし得る（例えば、癌の成長は、同じ癌に罹患している未処置の患者と比較して、鈍化または停止し得る）。

【0039】

本明細書中で言及される公開された特許、特許出願、ウェブサイト、企業名および科学文献は、当業者に利用可能な知識を確立しており、それぞれが参照により組み入れられると具体的かつ個々に示されるのと同程度まで、その全体が参照により本明細書中に組み入れられる。本明細書中で引用された任意の参照文献と本明細書の具体的な教示との間のいずれの矛盾も、後半を支持して解消されるであろう。

【0040】

本発明のさらなる態様、利点および実施形態は、以下により詳細に記載されている。本明細書中で言及される特許、公開された出願および科学文献は、当業者の知識を確立し、それぞれが参照により組み入れられると具体的かつ個々に示されるのと同程度まで、その全体が参照により本明細書中に組み入れられる。本明細書中で引用された任意の参照文献と本明細書の具体的な教示との間のいずれの矛盾も、後半を支持して解消されるであろう。同様に、単語もしくは語句の当該分野で理解される定義と本明細書中で具体的に教示される単語または語句の定義との間のいずれの矛盾も、後半を支持して解消されるであろう。本明細書中で使用する場合、以下の用語は、示された意味を有する。本明細書中で使用される場合、単数形「a」、「an」および「the」は、内容が明確に他を示さない限り、それらが言及する用語の複数形もまた具体的に包含する。用語「約」は、およそ、その領域中に、大まかにまたはその前後を意味するために本明細書中で使用される。用語「約」は、数値範囲と合わせて使用される場合、示された数値の上および下の境界を広げることによって、その範囲を改変する。一般に、用語「約」は、述べられた値の上および下の数値を20%の変動分改変するために、本明細書中で使用される。

【0041】

本明細書中で使用される技術用語および科学用語は、特に定義しない限り、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解される意味を有する。当業者に公知の種々の方法論および材料に対する言及が、本明細書中でなされる。全てその全体が参照により本明細書中に組み入れられる、抗体および組換えDNA技術の一般原理を示す標準的な参照研究には、HarlowおよびLane、Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1988年)、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1989年、および2010年9月までの改訂)、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989年); Kaufmanら、編、Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology in Medicine, CRC Press, Boca Raton (1995年); McPherson、編、Directed Mutagenesis: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1991年)が含まれる。全てその全体が参照により本明細書中に組み入れられる、薬理学の一般原理を示す標準的な参照研究には、GoodmanおよびGilmanのThe Pharmacological Basis of Therapeutics、第11編、McGraw Hill Companies Inc., New York (2006年)が含まれる。

【0042】

第1の態様において、本発明は、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。この方法は、以下の工程を含む：哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌から生

10

20

30

40

50

物学的サンプルを得る工程；および前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドに特異的に結合する少なくとも1つの試薬を利用して、前記ポリペプチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程。

【0043】

ヒトROSキナーゼ・タンパク質（ROS1遺伝子によってコードされる）は、癌を導く異常な発現の傾向がある、2347アミノ酸長のレセプター・チロシン・キナーゼである。全長ヒトROSキナーゼ（ヒトROSタンパク質のアミノ酸配列を有する）の説明は、UniProtアクセッション番号P08922において見出され得る。表1に示すように、ROSのシグナル・ペプチド・ドメイン、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよびキナーゼ・ドメインは、配列番号：1中の以下のアミノ酸残基において見出される：

【0044】

【表1】

表1

ドメイン	配列番号1中のアミノ酸残基
シグナル・ペプチド	1-27
細胞外ドメイン	28-1859
膜貫通ドメイン	1860-1882
キナーゼ・ドメイン	1945-2222

【0045】

さらに、ROSの天然に存在する複数の公知のバリエーションが存在する（例えば、Greenmanら、Nature 446巻：153～158頁、2007年を参照のこと）。マウス全長ROSのヌクレオチド配列およびアミノ酸配列が公知である（例えば、UniProtアクセッション番号Q78DX7を参照のこと）。慣用的な実験を使用して、生物学の当業者は、非ヒト哺乳動物ROSホモログ中の対応する配列を容易に決定することができる。

【0046】

「野生型」ROSとは、正常な個体（例えば、癌に罹患していない正常な個体）の健康な（または正常な）組織（例えば、非癌性組織）中の全長ROSキナーゼ（即ち、ヒトROSについて、2347アミノ酸長のポリペプチドまたはシグナル・ペプチド配列の除去後の2320アミノ酸長のポリペプチド）の発現および/または活性化を意味する。ROSキナーゼ（全長または切断型）は、ヒトにおける正常肺組織中では発現されないようである（例えば、以下の実施例を参照のこと）。しかし、以下の実施例に記載される方法を使用して、本発明者らは、肺癌中のROSキナーゼ発現の驚くべき発見をした。非典型的な細胞（この場合、癌性細胞）におけるかかる発現は、典型的な細胞（例えば、非癌性肺細胞）中で発現が見られない場合、異常である。

【0047】

別のタンパク質、即ちFIGとの融合物の形態で異常に発現されたROSキナーゼは、神経膠芽腫（Charestら、Genes Chromosomes Cancer 37巻：58～71頁、2003年；Charestら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100巻：916～921頁、2003年を参照のこと）および肝臓癌（例えば、PCT公開番号WO2010/093928を参照のこと）において報告されている。

【0048】

本明細書中で使用する場合、用語「ROS融合物」とは、別のポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の全てまたは一部に融合した、ROSタンパク質のキ

10

20

30

40

50

ナーゼ・ドメインを含むROSポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の一部をいい、その第2のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの名称が、融合物中で指定される（用語「融合物」は単純に、第2の遺伝子由来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの全てまたは一部に融合した、第1の遺伝子由来のポリペプチドまたはポリヌクレオチドの全てまたは一部を意味する）。例えば、SLC34A2-ROS融合物は、SLC34A2ポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の一部と、キナーゼ・ドメインROSを含むROSポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の一部との融合物である。ROS融合物は、染色体転座または逆位から生じることが多い。多数の公知のROS融合物が存在し、その全てが本発明のROS融合物であり、これには、そのメンバーとしてSLC34A2-ROS(VS)、SLC34A2-ROS(S)、SLC34A2-ROS(L)（米国特許公開番号20100143918を参照のこと）、CD74-ROS（米国特許公開番号20100221737を参照のこと）が含まれるSLC34A2-ROS融合タンパク質、ならびにそのメンバーとしてFIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)およびFIG-ROS(XL)（PCT公開番号WO2010/093928を参照のこと）が含まれるFIG-ROS融合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0049】

既知のROS融合タンパク質の全てが、全長ROSのキナーゼ・ドメイン全体を含む。従って、本明細書中で使用する場合、「ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド」（または「ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド」とは、全長ROSタンパク質のキナーゼ・ドメイン全体を含み、従ってROSキナーゼ活性を保持するタンパク質（またはポリペプチド）を意味する。ROSキナーゼ活性を有するタンパク質の非限定的な例には、全長ROSタンパク質、そのメンバーとしてSLC34A2-ROS(VS)、SLC34A2-ROS(S)、SLC34A2-ROS(L)（米国特許公開番号20100143918を参照のこと）、CD74-ROS（米国特許公開番号20100221737を参照のこと）が含まれるSLC34A2-ROS融合タンパク質、ならびにそのメンバーとしてFIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)およびFIG-ROS(XL)（PCT公開番号WO2010/093928を参照のこと）が含まれるFIG-ROS融合タンパク質、ならびに全長ROSキナーゼ・タンパク質のキナーゼ・ドメインを保持するROSキナーゼの任意の切断型形態または変異形態が含まれるが、これらに限定されない。ROSのキナーゼ・ドメインは配列番号：61に示されているので、「ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド」は、そのアミノ酸配列が配列番号：61を含むポリペプチドである。

20

30

【0050】

本明細書中で使用する場合、「ポリペプチド」（または「アミノ酸配列」もしくは「タンパク質」とは、好ましくは - アミノ酸、D - アミノ酸、L - アミノ酸およびそれらの組み合わせの、規定された順序での連結から形成されたポリマーをいう。1つのアミノ酸残基と次のアミノ酸残基との連結は、アミド結合またはペプチド結合と呼ばれる。ポリペプチドの非限定的な例には、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列、およびそれらのフラグメントまたは一部、天然に存在する分子または合成分子が含まれる。ポリペプチドには、糖タンパク質およびリポタンパク質ならびにより小さい分子量のポリペプチドなどの、誘導体化分子も含まれる。「アミノ酸配列」および同様の用語、例えば、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、示されたアミノ酸配列を、列挙したタンパク質分子に関連する完全なネイティブアミノ酸配列に限定する意味ではない。

40

【0051】

本発明のポリペプチド（例えば、FIG-ROS(S)ポリペプチド）のいくつかのアミノ酸配列は、変異体タンパク質の構造または機能の顕著な影響なしに変動させ得ることが、当該分野で認識される。配列におけるかかる差異が企図される場合、活性を決定するタンパク質上の必須領域（例えば、ROSのキナーゼ・ドメイン）が存在することに留意すべきである。一般に、類似の機能を果たす残基が使用されることを条件として、三次構

50

造を形成する残基を置き換えることが可能である。他の場合には、残基の型は、タンパク質の非必須領域において変更が生じる場合、完全に重要でない場合がある。

【0052】

従って、本発明のROS活性を有するポリペプチドにはさらに、実質的なROSキナーゼ活性を示す、本明細書中に記載される全長ROSタンパク質のバリエーションまたは種々のROS融合ポリペプチドが含まれる。いくつかの非限定的な保存的置換には、脂肪族アミノ酸Ala、Val、LeuおよびIleのうち1つの残基の別の残基での交換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換；酸性残基AspおよびGluの交換；アミド残基AsnおよびGlnの交換；塩基性残基LysおよびArgの交換；ならびに芳香族残基PheおよびTyrの交換が含まれる。当業者に公知の保存的アミノ酸置換のさらなる例は以下である：芳香族：フェニルアラニン トリプトファン チロシン（例えば、トリプトファン残基がフェニルアラニンで置き換えられる）；疎水性：ロイシン イソロイシン バリン；極性：グルタミン アスパラギン；塩基性：アルギニン リジン ヒスチジン；酸性：アスパラギン酸 グルタミン酸；低分子：アラニン セリン スレオニン メチオニン グリシン。上に詳細に示したように、どのアミノ酸変化が表現型的にサイレントである可能性が高い（即ち、機能に対する顕著な有害影響を有さない可能性が低い）かに関するさらなるガイダンスは、Bowieら、Science 247巻、上記中に見出され得る。

10

【0053】

いくつかの実施形態において、バリエーションは、「非保存的」変化、例えば、トリプトファンによるグリシンの置き換えを有し得る。類似のバリエーションは、アミノ酸の欠失もしくは挿入またはその両方もまた含み得る。生物学的活性も免疫学的活性も破壊することなしに、どのアミノ酸残基が置換、挿入または欠失され得るかを決定する際のガイダンスは、当該分野で周知のコンピュータ・プログラム、例えばDNASTARソフトウェアを使用して見出され得る。

20

【0054】

本発明のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドには、全長ヒトROSタンパク質（配列番号：1に示されるアミノ酸配列を有する）ならびに配列番号：5、7、22、28、56、58および60（リーダー配列を含むか否かにかかわらず）に示されるアミノ酸配列を有するROS融合ポリペプチド、融合接合部（即ち、非ROSパートナー・タンパク質とROSタンパク質との接合部における配列；表2を参照のこと）を包含する少なくとも6つ連続するアミノ酸を含むポリペプチドをコードするアミノ酸配列、ならびに上記のものに対して、少なくとも90%の類似性、より好ましくは少なくとも95%の類似性、なおより好ましくは少なくとも96%、97%、98%または99%の類似性を有するポリペプチドが含まれる。

30

【0055】

以下に記載されるようなROSポリペプチド発現および/もしくはROSキナーゼ活性を検出するためアッセイで有用な、またはROSタンパク質の機能/活性を阻害することが可能なROS阻害性治療剤としての、全長ROS特異的試薬およびROS融合ポリペプチド特異的試薬（例えば、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体）。さらに、かかるポリペプチドは、本発明に従う候補ROS阻害性治療剤でもあるROSタンパク質結合性タンパク質またはROS融合タンパク質結合性タンパク質を「捕捉する」ために、酵母ツー・ハイブリッド・システムにおいて使用され得る。酵母ツー・ハイブリッド・システムは、FieldsおよびSong、Nature 340巻：245~246頁（1989年）に記載されている。

40

【0056】

いくつかの実施形態において、この試薬はさらに、検出可能な標識（例えば、蛍光標識または赤外線標識）を含み得る。本明細書中に開示されるポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは試薬（例えば、抗体またはFISHプローブ）に関して、「検出可能な標識」とは、ポリペプチド、ポリヌクレオチドもしくは抗体の、またはポリペプチド、ポリヌクレ

50

オチドもしくは抗体に対する、化学的、生物学的または他の改変を意味し、これには、それによって目的の分子の存在が検出され得る、蛍光（例えば、FITCまたはフィコエリトリン）、赤外線、質量（例えば、等圧タグ）、残基、色素（発色団色素）、放射性同位体（例えば、 ^{32}P ）、標識またはタグ（mycタグまたはGSTタグ）改変などが含まれるが、これらに限定されない。かかるポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは試薬は従って、「検出可能に標識される」といわれる。検出可能な標識は、共有結合（例えば、ペプチド結合またはホスホジエステル結合）または非共有結合的結合（例えば、イオン結合）によって、ポリペプチド、ポリヌクレオチドまたは結合剤に付着され得る。

【0057】

本発明の方法において有用な試薬には、肺癌において発現される全長ROSタンパク質、または多くのROS融合タンパク質のうち1つに特異的に結合する、試薬、例えば、抗体もしくはAQUAペプチド、またはそれらの結合部分が含まれるが、これらに限定されない。「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、本発明の試薬または結合剤（例えば、核酸プローブ、抗体またはAQUAペプチド）が、その標的分子（例えば、ROS融合ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド、または全長ROSポリペプチドもしくはポリヌクレオチド）と相互作用することを意味し、この相互作用は、特定の構造（例えば、ポリペプチド上の抗原決定基もしくはエピトープ、またはポリヌクレオチドのヌクレオチド配列）の存在に依存する；言い換えれば、この試薬は、全てのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを一般に認識し結合するのではなく、特定のポリペプチドまたはポリヌクレオチド構造を認識し結合する。「その結合フラグメント」とは、標的分子に特異的に結合する試薬のフラグメントまたは一部（例えば、抗体のFabフラグメント）を意味する。

【0058】

標的分子に特異的に結合する試薬は、標的特異的試薬または抗標的試薬という場合がある。例えば、FIG-ROS(L)ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、FIG-ROS(L)特異的抗体または抗FIG-ROS(L)抗体という場合がある。同様に、FIG-ROS(L)ポリヌクレオチドに特異的に結合する核酸プローブは、FIG-ROS(L)特異的核酸プローブまたは抗FIG-ROS(L)核酸プローブという場合がある。

【0059】

いくつかの実施形態において、標的分子がポリペプチドである場合、標的分子に特異的に結合する試薬は、その標的分子（例えば、全長ROSまたはROS融合ポリペプチド）に対し、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 以下の結合親和性(K_D)を有する。いくつかの実施形態において、標的分子に特異的に結合する本発明の試薬は、その標的分子に対し、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 以下の K_D 、または $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 以下の K_D 、または $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 以下の K_D 、または $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 以下の K_D 、または $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 以下の K_D 、または $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 以下の K_D を有する。特定の実施形態において、標的分子に特異的に結合する本発明の試薬の K_D は、その標的分子に対し、 $1\text{pM} \sim 500\text{pM}$ 、または $500\text{pM} \sim 1\mu\text{M}$ の間、または $1\mu\text{M} \sim 100\text{nM}$ の間、または $100\text{mM} \sim 10\text{nM}$ の間である。本発明の試薬が特異的に結合する標的分子の非限定的な例には、全長ROSポリペプチド、またはSLC34A2-ROS(S)融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(VS)融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(L)融合ポリペプチド、CD74-ROS融合ポリペプチド、FIG-ROS(L)融合ポリペプチド、FIG-ROS(S)融合ポリペプチド、FIG-ROS(XL)融合ポリペプチドを含むROS融合ポリペプチドおよびそれらのフラグメント、特に、ROS融合ポリペプチドのROS部分と第2のタンパク質（例えば、SLC34A2、FIGまたはCD74）部分との接合部を含むフラグメントが含まれる。

【0060】

いくつかの実施形態において、標的分子がポリヌクレオチドである場合、その標的分子に特異的に結合する本発明の試薬は、ストリンジェントな条件下でその標的ポリヌクレオチドにハイブリダイズする試薬である。ヌクレオチド配列またはヌクレオチド・プローブ・ハイブリダイゼーション条件に関して、用語「ストリンジェントな条件」は、約 T_m マ

10

20

30

40

50

イナス5（即ち、試薬または核酸プローブの融解温度（ T_m ）の5下）から T_m の約20～25下までの範囲内に存在する「ストリンジェンシー」である。典型的なストリンジェントな条件は以下である：以下：50%ホルムアミド、5×SSC（750mM NaCl、75mMクエン酸三ナトリウム）、50mMリン酸ナトリウム（pH7.6）、5×デンハルト溶液、10%デキストラン硫酸および20マイクログラム/ml変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中での、42での一晚のインキュベーション、その後約65での0.1×SSC中でのフィルターの洗浄。当業者に理解されるように、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、同一または関連のポリヌクレオチド配列を同定または検出するために、変更され得る。「ストリンジェントな条件下で標的ポリヌクレオチド（例えば、全長ROSポリヌクレオチド）にハイブリダイズする試薬（例えば、ポリヌクレオチドまたはヌクレオチド・プローブ）」は、試薬（例えば、ポリヌクレオチドまたはヌクレオチド・プローブ（例えば、DNA、RNAまたはDNA-RNAハイブリッド））が、参照ポリヌクレオチドの長さ全体に沿ってハイブリダイズすること、または参照ポリヌクレオチドの少なくとも約15ヌクレオチド（nt）、もしくは少なくとも約20nt、もしくは少なくとも約30nt、もしくは約30～70ntである参照ポリヌクレオチドの一部にハイブリダイズすることを意図する。本発明のこれらのヌクレオチド・プローブは、本明細書中で考察されるような、診断プローブ（例えば、FISH用）およびプライマー（例えば、PCR用）として有用である。

【0061】

本発明の試薬が特異的に結合する標的分子の非限定的な例には、例えば配列番号：1の配列を含む全長ROSポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）、例えば配列番号：61の配列を含むROSタンパク質のキナーゼ・ドメイン（またはそれをコードするポリヌクレオチド）、ROSポリペプチドの膜貫通ドメイン（またはそれをコードするポリヌクレオチド）、例えば配列番号：58の配列を含むFIG-ROS（S）融合ポリペプチド（またはFIG-ROS（S）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号：56の配列を含むFIG-ROS（L）融合ポリペプチド（またはFIG-ROS（L）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号60の配列を含むFIG-ROS（VL）融合ポリペプチド（またはFIG-ROS（VL）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号：28の配列を含むSLC34A2-ROS（VS）融合ポリペプチド（またはSLC34A2-ROS（VS）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号7の配列を含むSLC34A2-ROS（S）融合ポリペプチド（またはSLC34A2-ROS（S）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号：5の配列を含むSLC34A2-ROS（L）融合ポリペプチド（またはSLC34A2-ROS（L）ポリヌクレオチド）、例えば配列番号22の配列を含むCD74-ROS融合ポリペプチド（またはCD74-ROSポリヌクレオチド）およびそれらのフラグメント、特に、ROS融合ポリペプチドのROS部分と第2のタンパク質（例えば、SLC34A2、FIGまたはCD74）の部分との接合部を含むフラグメント（例えば表2を参照のこと）が含まれる。

【0062】

開示された方法の実施において有用な試薬には、とりわけ、生物学的サンプル中の示されたポリペプチドの発現に対応する、ならびに示されたポリペプチドの発現の検出および定量に適切な、全長ROS特異的抗体およびROS融合ポリペプチド特異的抗体ならびにAQUAペプチド（重同位体標識されたペプチド）が含まれる。従って、「ROSポリペプチド特異的試薬」は、生物学的サンプル中の発現されたROSポリペプチドに特異的に結合することが可能な、発現されたROSポリペプチドの存在/レベルを検出および/または定量することが可能な、任意の生物学的または化学的な試薬である。ROS融合タンパク質中に存在するROSタンパク質の一部（例えばキナーゼ・ドメイン）に試薬が特異的に結合する場合にも、ROSポリペプチド特異的試薬は、生物学的サンプル中の発現されたROS融合ポリペプチドに特異的に結合することが可能で、発現されたROS融合ポリペプチドの存在/レベルを検出および/または定量することが可能である。この用語には、以下に考察する抗体およびAQUAペプチド試薬、ならびに本発明の範囲内の等価な

10

20

30

40

50

結合剤が含まれるが、これらに限定されない。

【0063】

いくつかの実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する試薬は抗体である。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、全長ROSポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、全長FIGポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、全長SLC34A2ポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、全長CD74ポリペプチドに特異的に結合する。いくつかの実施形態において、試薬（例えば抗体）は、ROS融合ポリペプチドに特異的に結合し、全長ROSまたはその融合パートナー（例えば、全長FIG、全長CD74または全長SLC34A2）のいずれかの全長ポリペプチドには特異的に結合しない。

10

【0064】

本発明の方法の実施においては、他の試薬、例えば、野生型ROSタンパク質配列の細胞外ドメイン中のエピトープに特異的に結合する（および従ってサンプル中の野生型ROSの存在（または非存在）を検出することが可能な）エピトープ特異的抗体、または野生型ROSタンパク質配列のキナーゼ・ドメイン中のエピトープに特異的に結合する（および従ってサンプル中のROSキナーゼ活性を有する任意のタンパク質の存在（または非存在）を検出することが可能な）エピトープ特異的抗体も有用である。

【0065】

肺癌中の全長ROSタンパク質、またはROS融合ポリペプチドの1つに特異的に結合する抗体は、他の哺乳動物種、例えばマウスまたはウサギ中の、高度に相同なおよび等価なエピトープ・ペプチド配列にも結合し得、逆もまた然りである。本発明の方法を実施するのに有用な抗体には、(a)モノクローナル抗体、(b)標的ポリペプチド（例えば、融合ポリペプチドの融合接合部）に特異的に結合する精製されたポリクローナル抗体、(c)他の非ヒト種（例えば、マウス、ラット）中の等価なおよび高度に相同なエピトープまたはリン酸化部位に特異的に結合する、上記(a)~(b)に記載された抗体、ならびに(d)本明細書中に開示された例示的抗体が結合する抗原（またはより好ましくはエピトープ）に特異的に結合する上記(a)~(c)のフラグメントが含まれる。

20

【0066】

用語「抗体」（"antibody"または"antibodies"）とは、その結合フラグメント（即ち、抗体の標的分子に特異的に結合することが可能な抗体のフラグメント、例えば、F_{ab}フラグメントおよびF(ab')₂フラグメント）を含む、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgEを含む全ての型の免疫グロブリン、ならびに組換え抗体、ヒト化抗体、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体および/またはそれらの結合フラグメントをいう。本発明の抗体は、任意の種の動物、例えば哺乳動物から誘導され得る。非限定的な例示的な天然抗体には、ヒト抗体を生成するように遺伝子操作されたトランスジェニックげっ歯類を含む、ヒト、ニワトリ、ヤギおよびげっ歯類（例えば、ラット、マウス、ハムスターおよびウサギ）から誘導された抗体が含まれる（例えば、本明細書中にその全体が参照により組み入れられる、Lonbergら、WO93/12227；米国特許第5,545,806号；およびKucherlapatiら、WO91/10741；米国特許第6,150,584号を参照のこと）。本発明の抗体は、キメラ抗体であってもよい。例えば、M.Wroslerら、Molec. Immunol. 26巻：403~111頁（1989年）；Morrissonら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. 81巻：6851頁（1984年）；Neubergerら、Nature 312巻：604頁（1984年）を参照のこと。これらの抗体は、米国特許第4,474,893号（Reading）または米国特許第4,816,567号（Cabillyら）中に開示された方法に従って生成される組換えモノクローナル抗体であり得る。これらの抗体はまた、米国特許第4,676,980号（Segelら）中に開示された方法に従って製造される、化学的に構築された特異的抗体であってもよい。

30

40

【0067】

50

天然の抗体は、宿主動物によって生成される抗体であるが、本発明は、アミノ酸配列がネイティブ抗体の配列とは異なっている、遺伝的に変更された抗体もまた企図する。組換えDNA技術の本出願への妥当性に起因して、これは、天然の抗体中に見出されるアミノ酸の配列に限定される必要はない；抗体は、所望の特徴を得るために再設計され得る。可能なバリエーションは多く、たった1個または数個のアミノ酸の変化から、例えば可変領域または定常領域の完全な再設計までの範囲に及ぶ。定常領域における変化は、一般に、補体結合、膜との相互作用および他のエフェクター機能などの特徴を改善または変更するために、行われる。可変領域における変化は、抗原結合特徴を改善するために行われる。用語「ヒト化抗体」とは、本明細書中で使用する場合、元の結合能をなおも保持したままで、ヒト抗体とより近く似せるために非抗原結合領域中のアミノ酸が置き換えられた、抗体分子をいう。他の具体的に企図される抗体は、オリゴクローナル抗体である。本明細書中で使用する場合、語句「オリゴクローナル抗体」とは、別個のモノクローナル抗体の所定の混合物をいう。例えば、PCT公開WO95/20401；米国特許第5,789,208号および米国特許第6,335,163号を参照のこと。一実施形態において、1つまたはそれ以上のエピトープに対する抗体の所定の混合物からなるオリゴクローナル抗体は、単一細胞中で生成される。他の実施形態において、オリゴクローナル抗体は、複数の特異性を有する抗体を生成するために、共通の軽鎖とペアリングすることが可能な複数の重鎖を含む（例えば、PCT公開WO04/009618）。オリゴクローナル抗体は、単一の標的分子上の複数のエピトープを標的化することが望まれる場合に特に有用である。本明細書中に開示されるアッセイおよびエピトープの観点から、当業者は、意図した目的および所望の要求のために適用可能な抗体または抗体の混合物を生成または選択することができる。

【0068】

組換え抗体もまた本発明中に含まれる。これらの組換え抗体は、天然の抗体と同じアミノ酸配列を有するか、または天然の抗体の変更されたアミノ酸配列を有する。これらは、原核生物および真核生物の両方の発現系を含む任意の発現系中で、またはファージ・ディスプレイ法を使用して作製され得る（例えば、その全体が参照により本明細書中に組み入れられる、Dowerら、WO91/17271およびMcCaffertyら、WO92/01047；米国特許第5,969,108号を参照のこと）。抗体は多くの方法で操作され得る。これらは、単鎖抗体（小モジュラー免疫医薬（immunopharmaceutical）またはSMIP（商標）が含まれる）、FabおよびF(ab')₂フラグメントなどとして製造され得る。抗体は、ヒト化、キメラ化、脱免疫化（deimmunized）、または完全にヒトであり得る。多数の刊行物が、多くの型の抗体およびかかる抗体を操作する方法を示している。例えば、米国特許第6,355,245号；米国特許第6,180,370号；米国特許第5,693,762号；米国特許第6,407,213号；米国特許第6,548,640号；米国特許第5,565,332号；米国特許第5,225,539号；米国特許第6,103,889号および米国特許第5,260,203号を参照のこと。本発明の遺伝的に変更された抗体は、上述の天然の抗体と機能的に等価であり得る。特定の実施形態において、本発明の改変された抗体は、改善された安定性または/および治療效能を提供する。

【0069】

改変された抗体の非限定的な例には、抗原結合の有用性を顕著に有害に変更しない、アミノ酸残基の保存的置換、およびアミノ酸の1つまたはそれ以上の欠失または付加を有する抗体が含まれる。置換は、治療上の有用性が維持される限り、1つまたはそれ以上のアミノ酸残基を変化または改変することから、領域の完全な再設計までの範囲に及び得る。本発明の抗体は、翻訳後に改変され得る（例えば、アセチル化および/またはリン酸化）か、または合成により改変され得る（例えば、標識化基の付着）。操作されたまたはバリエーションの定常領域またはFc領域を有する抗体は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）および補体依存性細胞傷害（CDC）などを改変するのに有用であり得る。かかる操作されたまたはバリエーションの定常領域またはFc領域を有する抗体は

10

20

30

40

50

、親シグナル伝達タンパク質が正常組織中で発現される場合に有用であり得る；これらの場合にエフェクター機能を有さないバリエーション抗体は、正常な組織に損傷を与えることなしに、所望の治療応答を惹起し得る。従って、本開示の特定の態様および方法は、1つまたはそれ以上のアミノ酸置換、挿入および/または欠失を含む、変更されたエフェクター機能を有する抗体に関する。用語「生物学的に活性な」とは、天然に存在する分子の構造的、調節的または生化学的機能を有するタンパク質をいう。同様に、「免疫学的に活性な」とは、天然、組換えもしくは合成の全長ROSタンパク質もしくはROS融合ポリペプチド（例えば、本明細書中に記載されるFIG-ROS融合ポリペプチドのうち1つ）またはそれらの任意のオリゴペプチドが、適切な動物または細胞中で特異的免疫応答を誘導する能力および特異的抗体と結合する能力をいう。

10

【0070】

単鎖抗体、ラクダ科動物抗体などを含む、4つ未満の鎖を有する抗体分子、ならびに重鎖または軽鎖が含まれる抗体の構成要素もまた、本発明の範囲内である。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン鎖は、5'から3'の順で、可変領域および定常領域を含み得る。可変領域は、構造FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3およびFR4になるように、散在するフレームワーク（FR）領域と共に、3つの相補性決定領域（CDR）を含み得る。重鎖または軽鎖の可変領域、フレームワーク領域およびCDRもまた、本発明の範囲内である。本発明の抗体は、CH1領域、ヒンジ、CH2およびCH3領域のいくつかまたは全てを含む、重鎖定常領域を含み得る。

【0071】

20

本発明の融合ポリペプチド特異的抗体の1つの非限定的なエピトープ部位は、融合ポリペプチド配列の約11～17アミノ酸から本質的になるペプチド・フラグメントであり、このフラグメントは、分子のROS部分と非ROS融合パートナー由来の分子の一部との融合接合部を包含する。ROS融合ポリペプチドの融合接合部を包含するより短いまたはより長いペプチド/エピトープに特異的に結合する抗体は、本発明の範囲内であることが理解される。

【0072】

本発明は、抗体の使用に限定されないが、本発明の方法において有用な全長ROS特異的抗体またはROS融合ポリペプチド特異的抗体が結合するのと本質的に同じエピトープに対し、ROSタンパク質特異的様式またはROS融合タンパク質特異的様式で結合する、タンパク質結合性ドメインまたは核酸アプタマーなどの等価な分子を含む。例えば、Neubergerら、Nature 312巻：604頁（1984年）を参照のこと。かかる等価な非抗体試薬は、以下にさらに記載される本発明の方法において適切に使用され得る。

30

【0073】

本発明の方法を実施するのに有用なポリクローナル抗体は、標準的な技術に従って、適切な動物（例えば、ウサギ、ヤギなど）を、所望の融合タンパク質特異的エピトープを包含する抗原（例えば、ROS融合ポリペプチド中の非ROSタンパク質パートナーとROSタンパク質パートナーとの融合接合部）で免疫し、動物から免疫血清を収集し、免疫血清からポリクローナル抗体を分離し、所望の特異性を有するポリクローナル抗体を精製することによって、公知の手順に従って生成され得る。抗原は、周知の技術に従って選択および構築された所望のエピトープ配列を含む合成ペプチド抗原であり得る。例えば、ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL、第5章、75～76頁、HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory（1988年）；Czerwik、Methods In Enzymology、201巻：264～283頁（1991年）；Merrifield、J. Am. Chem. Soc. 85巻：21～49頁（1962年）を参照のこと。本明細書中に記載されたように生成されたポリクローナル抗体は、以下にさらに記載されるようにスクリーニングおよび単離され得る。

40

【0074】

50

モノクローナル抗体はまた、本発明の方法において有益に利用され得、KohlerおよびMilstein、Nature 265巻：495～97頁（1975年）；KohlerおよびMilstein、Eur. J. Immunol. 6巻：511頁（1976年）の周知の技術に従って、ハイブリドーマ細胞株中で生成され得る；CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY、Ausubelら編（Wiley and Sons、New York、NY 1989年から2010年一杯までの毎年の更新）もまた参照のこと。そのように生成されたモノクローナル抗体は、高度に特異的であり、本発明によって提供されるアッセイ方法の選択性および特異性を改善する。例えば、適切な抗原（例えば、ROS融合ポリペプチドの融合接合部を含む合成ペプチド）を含む溶液が、マウス中に注射され得、（従来技術と調和する）十分な時間の後、マウスが屠殺され、脾臓細胞が得られ得る。次いで、脾臓細胞は、典型的にはポリエチレン・グリコールの存在下で骨髓腫細胞と融合させることによって不死化されて、ハイブリドーマ細胞が得られる。ウサギ融合ハイブリドーマは、例えば、米国特許第5,675,063号に記載されるように生成され得る。次いで、ハイブリドーマ細胞を、以下に記載するように、ヒポキサンチン・アミノプテリン・チミジン（HAT）などの適切な選択培地中で成長させ、上清が、所望の特異性を有するモノクローナル抗体についてスクリーニングされる。分泌された抗体は、例えば沈澱、イオン交換またはアフィニティ・クロマトグラフィーなどの従来の方法によって、組織培養上清から回収され得る。

10

【0075】

モノクローナルFabフラグメントは、当業者に公知の組換え技術によって、大腸菌中でも生成され得る。例えば、W. Huse、Science 246巻：1275～81頁（1989年）；Mullinaxら、Proc. Nat'l Acad. Sci. 87巻：8095頁（1990年）を参照のこと。1つのアイソタイプのモノクローナル抗体が特定の適用に望まれる場合、特定のアイソタイプは、最初の融合体から選択することによって直接調製され得る、またはクラス・スイッチ・バリエーションを単離するための同胞選択技術を使用することによって、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマから二次的に調製され得る（Steplewskiら、Proc. Nat'l Acad. Sci.、82巻：8653頁（1985年）；Spirarら、J. Immunol. Methods、74巻：307頁（1984年））。モノクローナル抗体の抗原結合部位は、PCRによってクローニングされ得る、単鎖抗体は、ファージ・ディスプレイされた組換え抗体または可溶性抗体として大腸菌中で生成され得る（例えば、ANTIBODY ENGINEERING PROTOCOLS、1995年、Humana Press、Sudhir Paul編者、を参照のこと）。

20

30

【0076】

なおさらに、米国特許第5,194,392号、Geysen（1990年）は、目的の抗体の特定のパラトープ（抗原結合部位）に対して相補的なエピトープの形態上の等価物（即ち、「ミモトープ」）であるモノマー（アミノ酸または他の化合物）の配列を検出または決定する一般的な方法を記載している。より一般的には、この方法は、目的の特定のレセプターのリガンド結合部位に対して相補的なリガンドのトポロジカルな等価物であるモノマーの配列を検出または決定することを含む。同様に、米国特許第5,480,971号、Houghtenら（1996年）は、線状C₁-C-ロシル・ペロシル化（rosyl perrosylated）オリゴペプチドならびにかかるペプチドのセットおよびライブラリー、ならびに目的のアクセプター分子に優先的に結合するペロシル化オリゴペプチドの配列を決定するためにかかるオリゴペプチドのセットおよびライブラリーを使用する方法を開示している。従って、本発明のエピトープ保有ペプチドの非ペプチド・アナログもまた、これらの方法によって慣用的に生成され得る。

40

【0077】

本発明の方法において有用な抗体は、ポリクローナルであれモノクローナルであれ、標準的な技術に従ってエピトープおよび融合タンパク質特異性についてスクリーニングされ得る。例えば、Czernikら、Methods in Enzymology、20

50

1 巻：264～283頁（1991年）を参照のこと。例えば、抗体は、所望の両方の抗原に対する特異性を確実にするために、および所望される場合には本発明の全長ROSタンパク質、特定のROS融合ポリペプチド（例えば、SLC34A2-ROS(S)ポリペプチド）またはそれらのフラグメントのみとの反応性について、特異性ELISAによってペプチド・ライブラリーに対してスクリーニングされ得る。所望の標的のみとの反応性を確認し、他のタンパク質に対する感知できる結合がないことを確実にするために、抗体はまた、標的タンパク質を含む細胞調製物に対するウエスタン・プロットングによって試験され得る。融合タンパク質特異的抗体の生成、スクリーニングおよび使用は、当業者に公知であり、記載されている。例えば、米国特許公開番号20050214301を参照のこと。

10

【0078】

本発明の方法において有用な抗体（例えば、全長ROSタンパク質特異的またはROS融合ポリペプチド特異的）は、類似の融合ポリペプチドなどの他のタンパク質またはポリペプチド中の類似のエピトープとの、いくらかの限定された交差反応性を示し得る。殆どの抗体がある程度の交差反応性を示すので、これは予測されないことであり、抗ペプチド抗体は、免疫化ペプチドに対して高い相同性または同一性を有するエピトープと交差反応することが多い。例えば、Czernik、上記を参照のこと。他の融合タンパク質との交差反応性は、既知の分子量のマーカと並べて、ウエスタン・プロットングによって容易に特徴付けられる。交差反応するタンパク質のアミノ酸配列は、抗体が結合する全長ROSタンパク質配列またはROS融合ポリペプチド（例えば、FIG-ROS(S)ポリペプチド）配列に対して高度に相同または同一な部位を同定するために試験され得る。望ましくない交差反応性は、ペプチド・カラムでの抗体精製を使用した陰性選択によって除去され得る。

20

【0079】

本明細書中で開示される方法を実施するのに有用な本発明のROS特異的抗体およびROS融合ポリペプチド特異的抗体は、理想的にはヒト融合ポリペプチドに対して特異的であるが、ヒト種自体に対する結合のみに限定されるわけではない。本発明は、他の哺乳動物種（例えば、マウス、ラット、サル）における保存され高度に相同または同一なエピトープにも結合する抗体の生成および使用を含む。他の種における高度に相同または同一な配列は、例えばBLASTを使用した、本明細書中に開示されるヒトROSタンパク質配列（配列番号：1）およびヒトROS融合ポリペプチド配列（配列番号：5、7、22、28、56、58および60）との標準的な配列比較によって、容易に同定され得る。

30

【0080】

本発明の方法において使用される抗体はさらに、特定のアッセイ形式、例えばFC、IHCおよび/またはICCによって特徴付けられ得、かかる特定のアッセイ形式での使用のために認証され得る。かかる方法における全長ROSタンパク質特異的抗体および/またはROS融合ポリペプチド特異的抗体の使用は、本明細書中にさらに記載される。単独でまたは以下に記載されるアッセイにおいて使用される、本明細書中に記載される抗体はまた、以下にさらに記載されるように、他のシグナル伝達（ホスホ-AKT、ホスホ-Erk1/2）および/または細胞マーカー（サイトケラチン）抗体と共にマルチ・パラメトリック分析において使用するために、蛍光色素（例えば、Alexa488、フィコエリトリン）または標識、例えば量子ドットに、有利にコンジュゲート化され得る。

40

【0081】

本発明の方法を実施する際に、所与の生物学的サンプル中の本発明のROS融合ポリペプチドおよび/または全長ROSの発現および/または活性も、全長ROSタンパク質に特異的な（即ち、それに特異的に結合する）抗体またはROS融合ポリペプチドに特異的な抗体を使用して、有利に試験され得る。例えば、ROS特異的抗体（即ち、全長ROSに特異的に結合する抗体）は、市販されている（例えば、Santa Cruz Biotech., Inc. (Santa Cruz, CA) カタログ番号sc-6347; Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA

50

)、カタログ番号3266) ; ならびにAbcam (Cambridge, MA)、カタログ番号ab5512およびab108492を参照のこと)。いくつかの実施形態において、本発明の方法において使用されるROS特異的抗体は、ROSのキナーゼ・ドメインに特異的に結合し、従って、本明細書中に記載される全長ROSおよび全てのROS融合ポリペプチドを検出する。いくつかの実施形態において、本発明の方法において使用されるROS特異的抗体は、ROSのキナーゼ・ドメインに対してC末端側のROSタンパク質上の領域に特異的に結合し、従って、本明細書中に記載される全長ROSおよび全てのROS融合ポリペプチドを検出する。かかる抗体は、標準的な方法に従っても生成され得る。

【0082】

生物学的サンプル(例えば、腫瘍サンプル)中の全長ROSの発現および/もしくは活性ならびに/またはROS融合ポリペプチド発現の検出は、融合タンパク質単独が腫瘍を駆動するか否か、または異常に発現された全長ROSもまた存在して腫瘍を駆動しているか否かについての情報を提供し得る。かかる情報は、融合タンパク質もしくは全長タンパク質(複数可)またはその両方を標的化するか否かを評価する際に臨床的に有用であるか、または腫瘍の進行を阻害する際および適切な治療剤またはその組み合わせを選択する際に、最も有益である可能性が高い。本明細書中に開示される変異体ROS中に存在しないROSキナーゼ細胞外ドメインに特異的な抗体は、変異体ROSキナーゼの存在/非存在を決定するために特に有用であり得る。

【0083】

1つより多い抗体が、本明細書中に記載される方法の実施において使用され得ることが理解される。例えば、1つまたはそれ以上のROS融合ポリペプチド特異的抗体は、ROS融合ポリペプチドが発現される癌において活性化されると疑われるまたは潜在的に活性化される別のキナーゼ、レセプターまたはキナーゼ基質に特異的な抗体と共に、かかる癌由来の細胞を含む生物学的サンプル中のかかる他のシグナル伝達分子の活性を検出するために、同時に使用され得る。

【0084】

当業者は、上記した本発明の融合ポリペプチドおよびそのエピトープ保有フラグメントが、他の分子の一部と組み合わせられて、キメラ・ポリペプチドを創出し得ることを理解する。例えば、全長ROSまたはROS融合ポリペプチドのエピトープ保有フラグメントは、免疫グロブリン(IgG)の定常ドメインと組み合わせられて、キメラ・ポリペプチドの精製を促進し得、そのキメラ・ポリペプチドの*in vivo*半減期を増加させ得る(例えば、EPA394, 827; Traunekerら、Nature 331巻: 84~86頁(1988年)中のCD4-Igキメラ・タンパク質の例を参照のこと)。ジスルフィド結合したダイマー構造(例えば、IgG部分由来)を有する融合タンパク質はまた、モノマー・ポリペプチド単独よりも、他の分子を結合および中和する際により効果的であり得る(Fountoulakisら、J Biochem 270巻: 3958~3964頁(1995年)を参照のこと)。

【0085】

いくつかの実施形態において、全長ROSまたはROS融合ポリペプチドに特異的に結合する試薬は、例えば、ROS融合ポリペプチドの融合接合部を含むペプチド配列に対応する、重同位体標識されたペプチド(即ち、AQUAペプチド)である。かかるAQUAペプチドは、生物学的サンプル中の発現されたFIG-ROS融合ポリペプチドの絶対的定量に適切であり得る。本明細書中で使用する場合、用語「重同位体標識されたペプチド」は、「AQUAペプチド」と相互交換可能に使用される。複雑な混合物中のタンパク質の絶対的定量または検出のためのAQUAペプチド(AQUA)の生成および使用が記載されている。WO/03016861、「Absolute Quantification of Proteins and Modified Forms Thereof by Multistage Mass Spectrometry」、Gygiら、およびまたGerberら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1

10

20

30

40

50

00巻：6940～5頁（2003年）（これらの教示は、本明細書により、その全体が参照により本明細書中に組み入れられる）を参照のこと。かかるAQUAペプチドに関して用語「特異的に検出する」とは、そのペプチドが、AQUAペプチド配列を含むポリペプチドおよびタンパク質のみを検出および定量し、AQUAペプチド配列を含まないポリペプチドおよびタンパク質を実質的に検出しないことを意味する。

【0086】

ペプチド標準との比較によって、生物学的サンプル中の、同じ配列およびタンパク質改変を有するペプチドの絶対量を決定するために、AQUA方法論は、消化された生物学的サンプル中への、既知の量の少なくとも1つの重同位体標識されたペプチド標準（LC-SRMクロマトグラフィーによって検出可能な独自のシグネチャーを有する）の導入を使用する。簡潔に述べると、AQUA方法論は、2つの段階を有する：ペプチド内部標準の選択および認証ならびに方法開発；およびサンプル中の標的タンパク質を検出および定量するための認証されたペプチド内部標準を使用した履行。この方法は、細胞溶解物などの複雑な生物学的混合物内の所与のペプチド/タンパク質を検出および定量するための強力な技術であり、例えば、薬物処置の結果としてのタンパク質リン酸化の変化を定量するため、または異なる生物学的状態にあるタンパク質のレベルにおける差異を定量するために、使用され得る。

【0087】

一般に、適切な内部標準を開発するために、標的タンパク質配列内の特定のペプチド（または改変されたペプチド）が、そのアミノ酸配列および消化のために使用される特定のプロテアーゼに基づいて選択される。次いで、1つの残基が、安定な同位体（ ^{13}C 、 ^{15}N ）を含む同じ残基で置換されるように、固相ペプチド合成によってペプチドが生成される。この結果は、タンパク質分解によって形成された、そのネイティブの対応物に対して化学的に同一なペプチドであるが、7-Daの質量シフトによりMSによって容易に識別可能である。次いで、新たに合成されたAQUA内部標準ペプチドは、LC-MS/MSによって評価される。このプロセスは、逆相クロマトグラフィー、イオン化効率、および衝突誘起解離を介したフラグメント化によって、ペプチド保持についての定性的情報を提供する。ネイティブ・ペプチドおよび内部標準ペプチドのセットについての情報をもたらす豊富なフラグメント・イオンが選択され、次いで、ペプチド標準の独自のプロファイルに基づいた選択される反応モニタリング（LC-SRM）法を形成するために、クロマトグラフィー保持の関数として、立て続けに特異的にモニタリングされる。

【0088】

AQUAストラテジーの第2段階は、複雑な混合物由来のタンパク質または改変されたタンパク質の量を測定するためのその履行である。細胞溶解物全体が、SDS-PAGEゲル電気泳動によって典型的には分画され、タンパク質移動と一致するゲルの領域が切り出される。このプロセスの後には、AQUAペプチドの存在下でのゲル内（in-gel）タンパク質分解と、LC-SRM分析とが続く（Gerberら、上記を参照のこと）。AQUAペプチドは、タンパク質分解酵素による細胞溶解物全体の消化によって得られた複雑なペプチド混合物中に混ぜ込まれ、上記のように、免疫親和性精製に供される。消化（例えばトリプシン処理）によって形成されたネイティブ・ペプチドの保持時間およびフラグメント化パターンは、以前に決定されたAQUA内部標準ペプチドのものと同一である；従って、SRM実験を使用したLC-MS/MS分析は、内部標準および非常に複雑なペプチド混合物に直接由来する分析物の両方の、高度に特異的かつ高感度の測定を生じる。

【0089】

絶対量のAQUAペプチドが添加されるので（例えば、250 fmol）、曲線下面積の比率は、元の細胞溶解物中のタンパク質の正確な発現レベルまたはタンパク質のリン酸化形態を決定するために使用され得る。さらに、ネイティブ・ペプチドが形成される場合、内部標準がゲル内消化の間に存在し、その結果、ゲル片からのペプチド抽出効率、サンプル取り扱い（真空遠心分離を含む）の間の絶対的損失、およびLC-MSシステム中へ

10

20

30

40

50

の導入の間の変動性は、ネイティブ・ペプチドおよびAQUAペプチドの存在量の決定された比率には影響を与えない。

【0090】

AQUAペプチド標準は、標的タンパク質内のIAP-LC-MS/MS法によって以前に同定された既知の配列について開発される。この部位が改変される場合、その部位内の特定の残基の改変された形態を取り込む1つのAQUAペプチドが開発され得、改変されていない形態の残基を取り込む第2のAQUAペプチドが開発され得る。この方法では、2つの標準が、生物学的サンプル中のこの部位の改変された形態および改変されていない形態の両方を検出および定量するために使用され得る。

【0091】

ペプチド内部標準はまた、タンパク質の一次アミノ酸配列を試験し、プロテアーゼ切断によって生成されるペプチドの境界を決定することによって、生成され得る。あるいは、タンパク質は、プロテアーゼによって実際に消化され得、生成された特定のペプチド・フラグメントが次いで配列決定され得る。適切なプロテアーゼには、セリン・プロテアーゼ（例えば、トリプシン、ヘブシン）、メタロ・プロテアーゼ（例えば、PUMP1）、キモトリプシン、カテプシン、ペプシン、サーモリシン、カルボキシペプチダーゼなどが含まれるが、これらに限定されない。

【0092】

標的タンパク質内のペプチド配列は、内部標準としてのペプチドの使用を最適化するために、1つまたはそれ以上の基準に従って選択される。好ましくは、ペプチドのサイズは、そのペプチド配列が他の非標的タンパク質中の別の箇所でも反復される可能性を最小化するために選択される。従って、ペプチドは、好ましくは少なくとも約6アミノ酸である。ペプチドのサイズは、イオン化周波数を最大化するためにも最適化される。従って、いくつかの実施形態において、このペプチドは、約20アミノ酸以下である。いくつかの実施形態において、このペプチドは、約7~15アミノ酸長の間である。質量分析の間に化学的に反応性である可能性が低いペプチド配列もまた選択され、こうして、システイン、トリプトファンまたはメチオニンを含む配列が回避される。

【0093】

標的領域の改変された領域を含まないペプチド配列が選択され得、その結果、ペプチド内部標準は、タンパク質の全ての形態の量を決定するために使用され得る。あるいは、改変されたアミノ酸を包含するペプチド内部標準は、改変された形態の標的タンパク質のみを検出および定量するために望ましい場合がある。改変された領域および改変されていない領域の両方についてのペプチド標準は、特定のサンプル中の改変の程度を決定するため（即ち、タンパク質の総量のどの部分が改変された形態によって示されるかを決定するため）に、一緒に使用され得る。例えば、特定の部位でリン酸化されることが公知のタンパク質のリン酸化形態および未リン酸化形態の両方についてのペプチド標準は、サンプル中のリン酸化形態の量を定量するために使用され得る。

【0094】

ペプチドは、1つまたはそれ以上の標識されたアミノ酸を使用して標識される（即ち、標識は、ペプチドの実際の部分である）か、またはあまり好ましくはないが、標識は、標準的な方法に従う合成の後に付着され得る。好ましくは、標識は、以下の条件に基づいて選択される質量変更標識である：質量は、MS分析によって生成されたフラグメント質量を、低い背景を有するスペクトルの領域にシフトさせるために独自であるべきである；イオン質量シグネチャー構成要素は、MS分析中の独自のイオン質量シグネチャーを好ましくは示す標識化部分の一部である；標識の構成原子の質量の合計は、可能な全てのアミノ酸のフラグメントとは独自に異なることが好ましい。結果として、標識されたアミノ酸およびペプチドは、得られた質量スペクトル中のイオン/質量パターンによって、標識されていないものから容易に識別される。好ましくは、イオン質量シグネチャー構成要素は、20種の天然アミノ酸のいずれかについての残基質量とは一致しない質量をタンパク質フラグメントに付与する。

10

20

30

40

50

【0095】

標識は、MSのフラグメント化条件下で強固でなければならず、好ましくないフラグメント化を受けない。標識化学は、様々な条件下、特に変性条件下で有効でなければならず、標識されたタグは、選択されたMS緩衝液系中で可溶性のままであることが好ましい。標識は好ましくは、タンパク質のイオン化効率を抑制せず、化学的に反応性でない。標識は、各標識されたフラグメント位置において独自の質量分析パターンを生成するように、2つ以上の同位体的に別個の種の混合物を含み得る。適切な同位体、例えば²H、¹³C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸Oまたは³⁴Sは、いくつかの非限定的な標識である。異なる同位体標識を組み込むペプチド内部標準の対もまた、調製され得る。重同位体標識が組み込まれ得る非限定的なアミノ酸残基には、ロイシン、プロリン、バリンおよびフェニルアラニンが含まれる。

10

【0096】

ペプチド内部標準は、質量対電荷(m/z)比に従って特徴付けられ、好ましくは、クロマトグラフィー・カラム(例えば、HPLCカラム)上でのその保持時間にも特徴付けられる。同一の配列の標識されていないペプチドと同時溶出する内部標準が、最適な内部標準として選択される。次いで、内部標準は、任意の適切な手段、例えばアルゴンまたはヘリウムなどを衝突ガスとして使用する衝突誘起解離(CID)などによってペプチドをフラグメント化することによって分析される。次いで、フラグメントは、フラグメント・イオン・スペクトルを得るため、ペプチド・フラグメント化シグネチャーを得るために、例えば多段階質量分析(MSⁿ)によって分析される。好ましくは、ペプチド・フラグメントは、各フラグメントに対応するピークが十分に分離できるように、m/z比において顕著な差異を有し、標的ペプチドについて独自のシグネチャーが得られる。適切なフラグメント・シグネチャーが第1の段階で得られない場合、独自のシグネチャーが得られるまで、さらなる段階のMSが実施される。

20

【0097】

MS/MSおよびMS³スペクトルにおけるフラグメント・イオンは典型的に、目的のペプチドに高度に特異的であり、LC法と合わせて、数千または数万のタンパク質を含む細胞溶解物などの複雑なタンパク質混合物中の標的ペプチド/タンパク質を検出および定量する高度に選択的な手段を可能にする。目的の標的タンパク質/ペプチドを潜在的に含む任意の生物学的サンプルがアッセイされ得る。粗細胞抽出物または部分的に精製された細胞抽出物が、好ましくは使用される。一般に、サンプルは、少なくとも0.01mgのタンパク質、典型的には0.1~10mg/mLの濃度を有し、所望の緩衝液濃度およびpHへと調整され得る。

30

【0098】

既知の量、好ましくは約10フェムトモル濃度の、検出/定量される標的タンパク質に対応する標識されたペプチド内部標準が次いで、細胞溶解物などの生物学的サンプルに添加される。次いで、混ぜ込まれたサンプルは、消化を可能にするのに適切な時間期間にわたり、1つまたはそれ以上のプロテアーゼ(複数可)で消化される。次いで、標識された内部標準およびその対応する標的ペプチドをサンプル中の他のペプチドから単離するために、(例えば、HPLC、逆相HPLC、キャピラリー電気泳動、イオン交換クロマトグラフィーなどによって)分離が実施される。マイクロキャピラリーLCは、1つの非限定的な方法である。

40

【0099】

次いで、各単離されたペプチドは、MSにおいて選択された反応をモニタリングすることによって試験される。これは、ペプチド内部標準の特徴付けによって獲得された予備知識を使用し、次いで、目的のペプチドおよび内部標準の両方についてのMS/MSまたはMSⁿスペクトルにおける特異的イオンを継続的にモニタリングするためにMSを必要とすることを含む。溶出後、ペプチド標準および標的ペプチドの両方のピークについての曲線下面積(AUC)が計算される。2つの面積の比率は、分析において使用される細胞の数およびタンパク質の分子量に対して標準化され得る絶対的定量を提供して、1細胞当た

50

りのタンパク質の正確なコピー数を提供する。AQUA方法論のさらなる詳細は、Gygira、およびGerberら、上記中に記載されている。

【0100】

AQUA内部ペプチド標準（重同位体標識されたペプチド）は望ましくは、上記のように、本発明の変異体ROSポリペプチド内の任意の独自の部位（例えば、FIG-ROS融合ポリペプチド内の融合接合部）を検出および定量するために生成され得る。例えば、FIG-ROS融合ポリペプチドのうち1つの融合接合部配列に対応するAQUAホスホペプチドが調製され得る。ペプチド標準は、FIG-ROS融合接合部について生成され得、かかる標準は、生物学的サンプル中の融合接合部（即ち、FIG-ROS融合ポリペプチドの存在）を検出および定量するために、AQUA方法論で使用され得る。

10

【0101】

例えば、1つの非限定的な本発明のAQUAペプチドは、FIG-ROS融合ポリペプチド（即ち、FIG-ROS(S)融合ポリペプチド）の短いバリエーション中の融合接合部の各側に直ぐ隣接する3つのアミノ酸に対応するアミノ酸配列

【化1】

AGSTLP (配列番号:66)

を含み、ここでFIG遺伝子によりコードされるアミノ酸はイタリックであり、ROS遺伝子によってコードされるアミノ酸は太字である。融合接合部配列（ならびにその下流および上流のさらなる残基）を含むより大きいAQUAペプチドもまた構築され得ることが理解される。同様に、かかる配列の残基の全てより少ない残基を含む（しかし、融合接合部自体の点はなおも含む）より小さいAQUAペプチドが、代替的に構築され得る。かかるより大きいまたはより短いAQUAペプチドは、本発明の範囲内であり、AQUAペプチドの選択および生成は、上記のように実施され得る（Gygira、Gerberら、上記を参照のこと）。

20

【0102】

本明細書中に記載されるROS融合タンパク質のうち1つの融合接合部に及ぶAQUAペプチドの配列は、ROS融合物特異的抗体が特異的に結合するエピトープでもあり得る（またはかかるエピトープ中に含まれ得る）からであることに留意すべきである。「エピトープ」とは、抗体が特異的に結合し得る免疫原性エピトープ（即ち、免疫応答を惹起することが可能である）または抗原性エピトープ（即ち、タンパク質分子の領域）のいずれかをいう。タンパク質の免疫原性エピトープの数は一般に、抗原性エピトープの数より少ない。例えば、Geysenら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81巻: 3998~4002頁(1983年)を参照のこと。

30

【0103】

表2は、本発明のROS融合ポリペプチドの全ての融合接合部の配列のリストを提供し、表中、非ROS遺伝子によってコードされるアミノ酸はイタリックであり、ROS遺伝子によってコードされるアミノ酸は太字である。

【0104】

【表 2】

表 2

融合物	接合部配列	配列番号
SLC34A2-ROS (非常に短い)	<i>VGVWHR</i>	62
SLC34A2-ROS (短い)	<i>LVGDDEF</i>	63
SLC34A2-ROS (長い)	<i>LVGAGV</i>	64
CD74-ROS	<i>PPKDDF</i>	65
FIG-ROS (短い)	<i>AGSTLP</i>	66
FIG-ROS (長い)	<i>LQVWHR</i>	67
FIG-ROS (余分に長い)	<i>VLQAGV</i>	68

10

【 0 1 0 5 】

20

いくつかの実施形態において、哺乳動物肺癌は、ヒト由来（即ち、ヒト）である。いくつかの実施形態において、哺乳動物肺癌は NSCLC（非小細胞肺癌腫）である。いくつかの実施形態において、哺乳動物肺癌は SCLC（小細胞肺癌腫）である。本発明の方法のさらなる実施形態において、哺乳動物はヒトであり、このヒトは、肺癌の処置のための ROS 阻害性治療剤のための候補であり得る。ヒト候補は、ROS キナーゼ・インヒビターで現在処置されている、または ROS キナーゼ・インヒビターでの処置が検討されている患者であり得る。別の実施形態において、哺乳動物は、大型動物、例えばウマまたはウシであるが、他の実施形態においては、哺乳動物は、小型動物、例えばイヌまたはネコであり、これらは全て、NSCLC および SCLC などの肺癌を発生させることが知られている。

30

【 0 1 0 6 】

本明細書中で使用する場合、用語「生物学的サンプル」は、その最も広い意味で使用され、ROS 融合ポリペプチドもしくは全長 ROS タンパク質（シグナル・ペプチド配列を有するまたは有さない）または ROS キナーゼ活性を有するそれらのフラグメントが含まれるがこれらに限定されない ROS キナーゼ活性を有するポリペプチドを含むと疑われる、任意の生物学的サンプルを意味する。生物学的サンプルには、唾液、粘膜、涙液、血液、循環腫瘍細胞、血清、組織、骨髄、リンパ液/間質液、頬細胞、粘膜細胞、脳脊髄液、精液、大便、血漿、尿、細胞の懸濁物、もしくは細胞およびウイルスの懸濁物またはそれらの抽出物が含まれるがこれらに限定されず、細胞、細胞から単離された染色体（例えば、中期染色体のスプレッド）、ゲノム DNA（溶液中、またはサザン分析などのために固体支持体に結合している）、RNA（溶液中、またはノーザン分析などのために固体支持体に結合している）、cDNA（溶液中、または固体支持体に結合している）を含み得る。いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは、癌性であると疑われる肺細胞を含む。

40

【 0 1 0 7 】

哺乳動物癌由来の細胞（または細胞の抽出物）を含む任意の生物学的サンプルは、本発明の方法での使用に適している。一実施形態において、生物学的サンプルは、腫瘍生検または腫瘍摘出から得られる細胞を含む。生検または摘出は、標準的な臨床技術に従って、哺乳動物の臓器中に発生した原発性腫瘍から、または他の組織に転移した二次腫瘍により得られ得る。別の実施形態において、生物学的サンプルは、腫瘍から採取された微細針吸

50

引から得られる細胞を含み、かかる吸引を得るための技術は当該分野で周知である (Cristalliniら、Acta Cytol. 36巻(3号): 416~22頁(1992年)を参照のこと)。

【0108】

生物学的サンプルは、胸水貯留などの浸出液から得られる細胞もまた含み得る。胸水貯留(胸腔中の肺の外側で形成する、癌性細胞を含む液体)は、進行した肺癌(NSCLCを含む)を有する多数の患者において形成することが公知であり、かかる浸出液の存在は、転帰不良および短い生存時間を予測する。胸水貯留サンプルを得るための標準的な技術は記載されており、当該分野で周知である(Sahn、Clin Chest Med. 3巻(2号): 443~52頁(1982年)を参照のこと)。

10

【0109】

生物学的サンプルは、気管支肺胞洗浄から得られる細胞を含み得る。気管支肺胞洗浄は、気管支鏡が口または鼻を通過して肺に至る標準的な医療手順であり、流体が、肺の小部分に吹きかけられ、次いで試験のために再収集される。

【0110】

いくつかの実施形態において、生物学的サンプルは循環腫瘍細胞を含む。循環腫瘍細胞(「CTC」)は、例えば、商標Vita-Assays(商標)、Vita-Cap(商標)およびCell Search(登録商標)(Vitatex、LLC(Johnson and Johnson corporation)から市販されている)の下で販売されるキットおよび試薬を使用して精製され得る。CTCを単離するための他の方法は記載されている(例えば、PCT公開番号WO/2002/020825、Cristofanilliら、New Engl. J. of Med. 351巻(8号): 781~791頁(2004年)およびAdamsら、J. Amer. Chem. Soc. 130巻(27号): 8633~8641頁(2008年7月)を参照のこと)。特定の実施形態において、循環腫瘍細胞(「CTC」)は、単離され得、肺起源であると同定され得る。

20

【0111】

従って、本発明は、CTCを単離し、次いでCTC中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドまたはそれをコードする核酸分子(例えば、全長ROSポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたはROS融合ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド)の存在を同定するために1つまたはそれ以上のアッセイ形式でCTCをスクリーニングする方法を提供する。

30

【0112】

本明細書中に記載される生物学的サンプルの細胞抽出物は、粗製であるかまたは標準的な技術に従って部分的に(もしくは完全に)精製されているかのいずれかで調製され得、本発明の方法において使用され得る。あるいは、細胞全体を含む生物学的サンプルは、以下に記載されるものなどの標準的な方法に従って、in vitroキナーゼ・アッセイ、ELISAアッセイ、免疫組織化学(IHC)、フロー・サイトメトリー(FC)および免疫蛍光(IF)、免疫組織化学(IHC)、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などのアッセイ形式で利用され得る(例えば、Ausubelら、上記もまた参照のこと)。かかる細胞全体アッセイは、腫瘍細胞サンプルの操作を最少化し、従って、細胞のin vivoシグナル伝達/活性化状態を変更するリスクおよび/またはアーチファクト・シグナルを導入するリスクを低減するという点で、有利である。細胞全体アッセイはまた、腫瘍細胞および正常細胞の混合物ではなく、腫瘍細胞中だけで発現およびシグナル伝達を特徴付けるので、有利である。

40

【0113】

従って、本発明の方法の実施において有用な生物学的サンプルは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、全長ROSポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたはROS融合ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド)の存在を特徴とする癌または疑わ

50

れる癌が存在するまたは存在し得るもしくは発生している可能性がある任意の哺乳動物から得られ得る。本明細書中で使用する場合、癌（または疑われる癌）および示された分子（例えば、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド）に関して、語句「～を特徴とする」とは、全長ROSおよび/またはROSキナーゼ活性を有するポリペプチドのかかる転座、異常な発現が存在しない別の癌または正常組織と比較して、遺伝子の転座もしくは変異（例えば、全長ROSの異常な発現を引き起こす）および/または発現されたROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（例えば、ROS融合ポリペプチド）が存在する癌（または疑われる癌）を意味する。全長ROSおよび/またはROSキナーゼ活性を有するポリペプチドのかかる転座、異常な発現の存在は、かかる癌または疑われる癌の成長および生存を、全体的にまたは部分的に駆動し得る（即ち、刺激し得るまたはその原因因子であり得る）。

10

【0114】

従って、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドまたはそれをコードするポリヌクレオチド（例えば、全長ROSポリペプチドもしくはポリヌクレオチドまたはROS融合ポリペプチドもしくはポリヌクレオチド）を含むと同定された患者由来の任意の生物学的サンプル（例えば、CTC、胸水貯留、針吸引、腫瘍生検など）は、患者の発生元の癌（例えば、NSCLCまたはSCLCなどの肺癌）がROSキナーゼ活性を有するポリペプチドによって駆動されており、従って、少なくとも1つのROSキナーゼ阻害性治療剤を含む組成物に対して応答する可能性が高いことを示し得る。

【0115】

本明細書中で使用する場合、「応答する可能性が高い」とは、癌が、ROS阻害性治療剤に応答して（例えば、ROS阻害性治療剤との接触またはROS阻害性治療剤による処置の際に）、成長の遅延または抑止を示す可能性がより高いことを意味する。いくつかの実施形態において、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い癌は、ROS阻害性治療剤に応答して死ぬ癌である（例えば、癌細胞はアポトーシスする）。

20

【0116】

哺乳動物癌腫瘍由来の細胞を含む生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）の存在を評価する際には、かかるROSキナーゼ活性を有するポリペプチドが存在しない細胞（例えば、健康な肺細胞）を提示するコントロール・サンプルが、望ましくは、比較目的のために使用され得る。理想的には、コントロール・サンプルは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）が存在しないサブセットを代表する特定の癌（例えば肺癌）のサブセット由来の細胞を含む。従って、コントロール・サンプル対試験生物学的サンプル中のレベルを比較することで、変異体ポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチド（複数可）が存在するか否かが同定される。あるいは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）は、大多数の癌には存在しない場合があるので、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）を同様に発現しない任意の組織が、コントロールとして使用され得る。

30

【0117】

以下に記載される方法は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの存在を特徴とする癌およびその癌に関する処置決定についての有益な診断有用性を有する。例えば、生物学的サンプルは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの存在を特徴とする癌を有すると以前に診断されておらず、かかる癌に対する処置を受けてもいない被験体から得られ得、この方法は、かかる被験体中の腫瘍が、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（またはそれをコードするポリヌクレオチド）が存在する/発現される腫瘍（例えば、NSCLCまたはSCLC）のサブセットに属すると診断的に同定するために使用される。

40

【0118】

あるいは、生物学的サンプルは、EFGRなどのキナーゼの1つの型の存在を特徴とする癌を有すると診断され、かかる癌の処置のためにEGFRインヒビター治療（例えば、

50

Tarceva (商標)、Iressa (商標)) などの治療を受けていた被験体から得られ得、本発明の方法は、被験体の腫瘍がROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(またはそれをコードするポリヌクレオチド)、例えば、全長ROSタンパク質、または多数のROS融合ポリペプチドのうち1つ(例えば、SLC34A2-ROS(S))の存在もまた特徴とするか否か、従って、既存の治療に完全に応答する可能性が高いか否か、および/または代替的もしくはさらなるROS阻害性治療が望ましいもしくは認可されるか否かを同定するために使用される。本発明の方法は、ROS阻害性治療剤または治療剤の組み合わせを含む組成物による被験体の処置後に、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドを発現する癌の進行または阻害をモニタリングするためにも使用され得る。

【0119】

かかる診断アッセイは、予備評価または外科的調査手順の後またはその前に、実施され得る。本発明の同定方法は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド、例えばROS融合タンパク質(例えば、FIG-ROS(S))の存在を特徴とする肺癌(例えば、非小細胞肺癌)などの癌を有する患者を同定するための診断剤として有利に使用され得、この患者は、ROSキナーゼ活性を阻害することを標的化した治療剤に応答する可能性が最も高い。かかる患者を選択する能力は、さらなるROS阻害性治療剤の効能の臨床的評価ならびにかかる薬物の患者へのさらなる処方においても有用である。

【0120】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(またはそれをコードするポリヌクレオチド)、例えばROS融合タンパク質もしくはROS融合ポリヌクレオチドまたは全長ROSポリペプチドもしくは全長ROSポリヌクレオチド(複数可)が存在する癌を選択的に同定する能力は、診断目的のためにかかる腫瘍を正確に同定するため、ならびにかかる腫瘍がROS阻害性治療剤組成物に反応する可能性が高いか否か、または癌の処置のための単一の薬剤として投与される場合に異なるキナーゼを標的化するインヒビターに対して部分的もしくは完全に非応答性である可能性が高いか否かを決定する際に有用な情報を得るための、重要な新規方法を可能にする。

【0121】

本明細書中で使用する場合、「癌」または「癌性」とは、同じ細胞型の正常(即ち非癌性)細胞と比較して、異常な成長を示す細胞を意味する。例えば、癌性細胞は、転移性または非転移性であり得る。癌性細胞はまた、同じ細胞型の正常細胞が接触阻害を示す場合、接触阻害の欠如を示し得る。いくつかの実施形態において、癌は肺癌(例えば、非小細胞肺癌または小細胞肺癌)である。本明細書中で使用する場合、「疑われる癌」(「疑われる哺乳動物肺癌」でも同様)または「癌性であると疑われる組織」とは、疑われる癌と同じ細胞または組織型の正常細胞または組織と比較していくつかの異常な特徴(例えば、過形成性、または接触阻害の欠如)を有する細胞または組織であるが、医師または病理学者によって癌性であると未だ確認されていない細胞または組織を意味する。

【0122】

いくつかの実施形態において、本発明の種々の方法が、当業者に公知の種々の異なるアッセイ形式で実施され得る。方法のいくつかの非限定的な例には、免疫アッセイならびにペプチド・アッセイおよびヌクレオチド・アッセイが含まれる。

【0123】

免疫アッセイ

本発明の方法の実施において有用な免疫アッセイは、均一系免疫アッセイまたは不均一系免疫アッセイであり得る。均一系アッセイにおいて、免疫学的反応は通常、特異的試薬(例えば、ROS特異的抗体)、標識された分析物および目的の生物学的サンプルを含む。標識から生じるシグナルは、標識された分析物に対する抗体の結合の際に、直接的または間接的に改変される。免疫学的反応および反応の程度の検出の両方が、均一溶液中で実施される。使用され得る免疫化学的標識には、フリー・ラジカル、放射性同位体、蛍光色素、酵素、バクテリオファージ、補酵素などが含まれる。半導体ナノ結晶標識または「量子ドット」もまた有利に使用され得、それらの調製および使用は充分記載されてい

10

20

30

40

50

る。K. Barovsky, *Nanotech. Law & Bus.* 1巻(2号): Article 14 (2004年) およびそこで引用された特許を一般に参照のこと。

【0124】

不均一系アッセイ・アプローチにおいて、これらの材料は通常、生物学的サンプル、結合試薬(例えば抗体)、および検出可能なシグナルを生成するのに適した手段である。以下にさらに記載される生物学的サンプルが使用され得る。抗体は一般に、ビーズ、プレートまたはスライドなどの支持体上に固定化され、液相中で抗原を含むと疑われるサンプルと接触させられる。次いで支持体は、液相から分離され、支持体相または液相のいずれかが、かかるシグナルを生成する手段を使用して、検出可能なシグナルについて試験される。このシグナルは、生物学的サンプル中の分析物の存在に関連している。検出可能なシグナルを生成する手段は、放射性標識、蛍光標識、酵素標識、量子ドットなどの使用を含む。例えば、検出される抗原が第2の結合部位を含む場合、この部位に結合する抗体は、検出可能な基にコンジュゲート化され得、分離工程の前に液相反応溶液に添加され得る。固体支持体上の検出可能な基の存在は、試験サンプル中の抗原の存在を示す。適切なイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光法、酵素結合イムノアッセイなどである。

10

【0125】

本明細書中に開示された方法を実施するために有用であり得るイムノアッセイ形式およびそのバリエーションは、当該分野で周知である。E. Maggio, *Enzyme-Immunoassay*, (1980年)(CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.) を一般に参照のこと; 例えば、米国特許第4,727,022号(Skoldら、「Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application」); 米国特許第4,659,678号(Forrestら、「Immunoassay of Antigens」); 米国特許第4,376,110号(Davidら、「Immunoassays Using Monoclonal Antibodies」)もまた参照のこと。試薬-抗体複合体の形成に適した条件は、当業者に周知である。同上を参照のこと。ROS特異的抗体は、「2部位(two-site)」または「サンドイッチ」アッセイにおいて使用され得、単一のハイブリドーマ細胞株が、標識されたモノクローナル抗体および結合したモノクローナル抗体の両方について供給源として機能する。かかるアッセイは、米国特許第4,376,110号に記載されている。検出可能な試薬の濃度は、ROSキナーゼ活性を有するタンパク質(例えば、全長ROSタンパク質またはROS融合ポリペプチド)の結合が背景と比較して検出可能となるのに充分でなければならない。

20

30

【0126】

本明細書中に開示された方法の実施において有用な抗体は、沈澱などの公知の技術に従って、診断アッセイに適した固体支持体(例えば、ラテックスまたはポリスチレンなどの材料から形成されたビーズ、プレート、スライドまたはウェル)にコンジュゲート化され得る。抗体または他の結合試薬は、公知の技術に従って、放射性標識(例えば、³⁵S、¹²⁵I、¹³¹I)、酵素標識(例えば、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ、ロザリン(rosaline)ホスファターゼ)および蛍光標識(例えば、フルオレセイン)などの検出可能な基に、同様にコンジュゲート化され得る。

40

【0127】

細胞ベースのアッセイ、例えば、フロー・サイトメトリー(FC)、免疫組織化学(IHC)または免疫蛍光(IF)は、臨床的に適切であり、ROSキナーゼ活性を有するタンパク質(例えば、全長ROSポリペプチドまたはROS融合ポリペプチド)の*in vivo*での発現の検出を可能にし、抽出物を得るために例えば腫瘍サンプルから得られた細胞を操作することから生じる活性におけるアーチファクト変化のリスクを回避するので、かかるアッセイ形式は、本発明の方法を実施する際に特に望ましい。従って、いくつかの実施形態において、本発明の方法は、フロー・サイトメトリー(FC)、免疫組織化学

50

(I H C) または免疫蛍光 (I F) アッセイ形式で実施される。

【 0 1 2 8 】

フロー・サイトメトリー (F C) は、 R O S キナーゼ活性を阻害することを標的化した薬物での処置の前、その間およびその後、哺乳動物腫瘍中の R O S キナーゼ活性を有するポリペプチドの発現を決定するために使用され得る。例えば、微細針吸引由来の腫瘍細胞は、 R O S キナーゼ活性を有するポリペプチドまたはそれをコードするポリヌクレオチド (例えば、全長 R O S ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドまたは R O S 融合ポリヌクレオチドもしくはポリペプチド) の発現および / または活性化について、ならびにそのように望まれる場合には癌細胞型などを同定するマーカーについて、フロー・サイトメトリーによって分析され得る。フロー・サイトメトリーは、標準的な方法に従って実施され得る。例えば、Chowら、Cytometry (Communications in Clinical Cytometry) 46巻 : 72 ~ 78頁 (2001年) を参照のこと。簡潔に例として述べると、サイトメトリー分析のための以下のプロトコルが使用され得る : 2%パラホルムアルデヒドで37 で10分間の細胞の固定、その後氷上で10分間の90%メタノールでの透過処理。次いで細胞は、一次抗体 (例えば、全長 R O S 特異的抗体または R O S 融合ポリペプチド特異的抗体) で染色され、洗浄され、蛍光標識された二次抗体で標識され得る。次いで細胞は、使用される機器の具体的なプロトコルに従って、フロー・サイトメータ (例えば、Beckman Coulter FC500) で分析される。かかる分析は、腫瘍中の発現された全長 R O S または R O S 融合ポリペプチドのレベルを同定する。 R O S 阻害性治療剤による腫瘍の処置後の同様の分析は、 R O S キナーゼの標的化インヒビターに対する全長 R O S 発現腫瘍または R O S 融合ポリペプチド発現腫瘍の応答性を明らかにする。

【 0 1 2 9 】

免疫組織化学 (I H C) 染色もまた、 R O S キナーゼ活性を阻害することを標的化する治療剤での処置の前、その間またはその後、哺乳動物癌 (例えば肺癌) 中の R O S キナーゼ活性を有するポリペプチドの発現および / または活性化状態を決定するために使用され得る。 I H C は、周知の技術に従って実施され得る。例えば、ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL、第10章、HarlowおよびLane編、Cold Spring Harbor Laboratory (1988年) を参照のこと。簡潔に例として述べると、パラフィン包埋した組織 (例えば、生検由来の腫瘍組織) は、キシレンに次ぎエタノールで組織切片を脱パラフィン化すること ; 水、次いで P B S 中で水和すること ; クエン酸ナトリウム緩衝液中でスライドを加熱することによって抗原をアンマスキングすること ; 過酸化水素中で切片をインキュベートすること ; ブロッキング溶液中でブロッキングすること ; 一次抗体 (例えば、 R O S 特異的抗体) および二次抗体中でスライドをインキュベートすること ; ならびにアビジン / ビオチン法を使用して最後に検出することによって、免疫組織化学染色のために調製され得る。

【 0 1 3 0 】

免疫蛍光 (I F) アッセイもまた、 R O S キナーゼ活性を阻害することを標的化する治療剤での処置の前、その間またはその後、哺乳動物癌中の R O S キナーゼ活性を有するポリペプチド (例えば、全長 R O S ポリペプチドまたは R O S 融合ポリペプチド) の発現および / または活性化状態を決定するために使用され得る。 I F は、周知の技術に従って実施され得る。例えば、J . M . polak および S . Van Noorden (1997年) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY、第2版 ; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37、BioScientific / Springer - Verlag を参照のこと。簡潔に例として述べると、患者サンプルは、パラホルムアルデヒドに次いでメタノール中で固定され、ウマ血清などのブロッキング溶液でブロッキングされ、 R O S キナーゼ活性を有するポリペプチド (例えば、 C D 7 4 - R O S 融合ポリペプチド) に対する (即ち、それに特異的に結合する) 一次抗体に次いで A l e x a 4 8 8 などの蛍光色素で標識された二次抗体と共にインキュベートされ、落射蛍光顕微鏡で分析され得る。

【 0 1 3 1 】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの発現および/または活性を測定するための、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A)、ラジオイムノアッセイ (R I A)、ウエスタン・ブロッティング分析、*in vitro*キナーゼ・アッセイおよび蛍光活性化セル・ソーティング (F A C S) を含む種々の他のプロトコルは、当該分野で公知であり、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド (例えば、全長ROS、またはFIG-ROS (S) 融合ポリペプチドなどのROS融合ポリペプチド) の存在を診断するための基礎を提供する。全長ROSポリペプチド発現の正常値または標準値は、正常な哺乳動物被験体、好ましくはヒトから採取した体液または細胞抽出物を、全長ROSポリペプチドに特異的に結合する抗体と、複合体形成に適した条件下で合わせることによって、確立される。標準的な複合体形成の量は、種々の方法により定量され得るが、好ましくは測光手段によって定量され得る。生検組織由来の被験体サンプル、コントロール・サンプルおよび疾患サンプル中の発現された全長ROSポリペプチドの量は、標準値と比較される。標準値と被験体値との間のずれは、疾患を診断するためのパラメータを確立する。もちろん、本明細書中で記載するように、ROSキナーゼ活性を有するタンパク質 (例えば、FIG-ROS (S) またはSLC34A2-ROS (S)) は、癌性肺組織において発見されたので、正常な肺組織の生物学的サンプルは、これらのROSキナーゼ活性を有するタンパク質 (またはそれをコードするポリヌクレオチド) を含まないと予測される。

10

【 0 1 3 2 】

別の態様において、本発明は、哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌由来の生物学的サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在を検出する方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：(a) 哺乳動物肺癌または疑われる哺乳動物肺癌から生物学的サンプルを得る工程、および(b) 前記生物学的サンプルに対する試薬の特異的結合の検出が、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在することを示す、ROSキナーゼ活性を有する前記ポリペプチドをコードする前記ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬を利用して、前記ポリヌクレオチドが前記生物学的サンプル中に存在するか否かを決定する工程。

20

【 0 1 3 3 】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの存在は、任意の標準的な方法によって評価され得る。さらに、これらの方法は、上記のように、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドを検出するための方法と組み合わせられ得る。

30

【 0 1 3 4 】

ヌクレオチド・アッセイ

本発明の方法の実施において有用な全長ROSポリヌクレオチドまたはROS融合ポリヌクレオチド特異的結合試薬はまた、生物学的サンプル中の融合ポリペプチド発現転写物または切断型ポリペプチド発現転写物に直接ハイブリダイズし、それを検出し得る、mRNA、オリゴヌクレオチドまたはDNAプローブであり得る。かかるプローブは、本明細書中で詳細に考察されている。簡潔に例として述べると、ホルマリン固定パラフィン包埋 (P P F E) 患者サンプルは、フルオレセイン標識されたRNAプローブで精査され、次いでホルムアミド、SSCおよびPBSで洗浄され、蛍光顕微鏡で分析され得る。

40

【 0 1 3 5 】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた、診断目的に使用され得る。使用され得るポリヌクレオチドには、オリゴヌクレオチド配列、アンチセンスRNAおよびDNA分子、ならびにPNAが含まれる。ポリヌクレオチドは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド (例えば、ROS融合ポリペプチドまたは全長ROS) の発現が疾患と関連し得る生検組織中の遺伝子発現を検出および定量するために使用され得る。診断アッセイは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの非存在と、存在と、過剰な発現とを識別するため、および治療的介入の間にROSキナーゼ活性を有するポリペプチドのレベルの調節をモニタリングするために、使用され得る。

50

【0136】

一実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする（例えば、ROS融合ポリペプチドまたは全長ROSタンパク質をコードする）、ゲノム配列を含むポリヌクレオチド配列を検出することが可能なPCRプライマーを用いたハイブリダイゼーションが、かかるROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸配列を同定するために使用され得る。それが高度に特異的な領域、例えば融合接合部中の10個の独自のヌクレオチドから作成されたにしろ、特異性の低い領域、例えば3'コード領域から作成されたにしろプローブの特異性、ならびにハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジエンシー（最大、高い、中間または低い）は、このプローブが、ROSキナーゼ・ポリペプチド（例えば、全長ROSまたはROS融合タンパク質）、対立遺伝子または関連配列をコードする天然に存在する配列のみを同定するか否かを決定する。

10

【0137】

プローブは、関連配列の検出のためにも使用され得、変異体ROSポリペプチド・コード配列のいずれか由来のヌクレオチドを少なくとも50%好ましくは含まなければならない。本発明のハイブリダイゼーション・プローブ（例えば、FISHプローブまたはサザン・プロットング・プローブもしくはノーザン・プロットング・プローブ）は、DNAまたはRNAであり得、配列番号：_____のヌクレオチド配列[ROSおよび全てのROS融合タンパク質のDNA配列]から誘導され得る。いくつかの実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドがROS融合タンパク質である場合、融合接合部を包含する、またはプロモーター、エンハンサー・エレメント、ならびに天然に存在するROS遺伝子および融合パートナー遺伝子（例えば、SLC34A2、FIGまたはCD74）のイントロンを含むゲノム配列由来の、ハイブリダイゼーション・プローブ。

20

【0138】

ROS融合ポリヌクレオチド（即ち、FIG-ROS(S)またはCD74-ROSなどのROS融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド）または全長ROSポリヌクレオチドは、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの変更された発現を検出するために患者生検由来の流体または組織を利用する、サザンもしくはノーザン分析、ドット・プロットもしくは他のメンブレン・ベースの技術において；PCR技術において；またはディップ・スティック、ピン、ELISAもしくはチップ・アッセイにおいて、使用され得る。かかる定性的方法および定量的方法は、当該分野で周知である。特定の態様において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、非小細胞肺癌腫(NSCLC)および小細胞肺癌腫を含む種々の肺癌の活性化または誘導を検出するアッセイにおいて有用であり得る。ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、標準的な方法によって検出可能に標識され得、ハイブリダイゼーション複合体の形成に適した条件下で、患者由来の流体または組織サンプルに添加され得る。適切なインキュベーション期間の後、サンプルは洗浄され、シグナルが定量されて標準値と比較される。生検サンプルまたは抽出サンプル中のシグナルの量が、比較可能なコントロール・サンプルのシグナルの量から顕著に変更されている場合、そのヌクレオチド配列は、サンプル中のヌクレオチド配列とハイブリダイズしており、サンプル中のROSキナーゼ活性を有するポリペプチド（例えば、ROS融合ポリペプチドまたは全長ROSポリペプチド）をコードするヌクレオチド配列の存在または変更されたレベルは、関連する疾患の存在を示す。かかるアッセイは、動物研究、臨床試験における特定の治療的処置レジメンの効能を評価するため、または個々の患者の処置をモニタリングする際にも、使用され得る。

30

40

【0139】

いくつかの実施形態において、本発明の方法は、PCRアッセイ形式を使用して実施される。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)は、当業者にとって標準的である。例えば、MOLECULAR CLONING、A LABORATORY MANUAL、第2版、Sambrook, J., Fritsch, E. F. および Maniatis, T. 編、Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold

50

Spring Harbor, N. Y. (1989年)を参照のこと。PCRプライマー(オリゴマーとも呼ばれる)は、化学的に合成され得、酵素的に生成され得、または組換え供給源から生成され得る。オリゴマーは、好ましくは2つのヌクレオチド配列からなり、一方はセンス方向(5'から3')であり、もう一方はアンチセンス方向(3'から5')であり、特定の遺伝子または状態の同定のために最適化された条件下で使用される。同じ2つのオリゴマー、オリゴマーのネステッド・セット、またはさらにはオリゴマーの変性プールが、密接に関連したDNAまたはRNA配列の検出および/または定量的のために、あまりストリンジентでない条件下で使用され得る。

【0140】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、ROS融合ポリペプチドまたは完全ROSポリペプチド)の発現を定量するためにも使用され得る方法には、ヌクレオチドを放射性標識またはビオチン化すること、コントロール核酸の同時増幅、および実験結果を解釈するための検量線が含まれる(Melbyら、J. Immunol. Methods、159巻:235~244頁(1993年); Duplaaら、Anal. Biochem. 229~236頁(1993年))。複数のサンプルの定量的速度は、目的のオリゴマーが種々の希釈で提示されるELISA形式でアッセイを実行することによって加速され得、分光光度的または比色的な応答が、迅速な定量を与える。

【0141】

本発明の別の実施形態において、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、天然に存在するゲノム配列をマッピングするために有用なハイブリダイゼーション・プローブを生成するために使用され得る。配列は、周知の技術を使用して、特定の染色体または染色体の特定の領域にマッピングされ得る。かかる技術には、Price, C. M., Blood Rev. 7巻:127~134頁(1993年)およびTrask, B. J., Trends Genet. 7巻:149~154頁(1991年)で概説されるような、蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)、FACSまたは人工染色体構築、例えば酵母人工染色体、細菌人工染色体、細菌P1構築もしくは単一染色体cDNAライブラリーが含まれる。

【0142】

さらなる実施形態において、蛍光in-situハイブリダイゼーション(FISH)が、本発明の方法において使用される(Vermaら、HUMAN CHROMOSOMES: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES、Pergamon Press、New York、N. Y. (1988年)中に記載されるとおり)。いくつかの実施形態において、FISHアッセイは、他の物理的染色体マッピング技術および遺伝子マップ・データと相関し得る。FISH技術は周知である(例えば、米国特許第5,756,696号;米国特許第5,447,841号;米国特許第5,776,688号;および米国特許第5,663,319号を参照のこと)。遺伝子マップ・データの例は、1994年のGenome Issue of Science(265:1981f)に見出され得る。物理的染色体マップ上の、ROSタンパク質をコードする遺伝子および/またはROS融合ポリペプチドの場合にはROS融合タンパク質の融合パートナーをコードする遺伝子(例えば、FIG遺伝子、SLC34A2遺伝子またはCD74遺伝子)の位置と、特定の疾患または特定の疾患の素因との相関は、遺伝疾患に関連するDNAの領域を区切るのを助け得る。本発明のヌクレオチド配列は、正常個体、キャリア個体または罹患個体間の遺伝子配列における差異を検出するために使用され得る。

【0143】

染色体調製物のin-situハイブリダイゼーションおよび物理的マッピング技術、例えば確立された染色体マーカーを使用する連鎖分析が、遺伝子マップを拡張するために使用され得る。マウスなどの別の哺乳動物種の染色体上の遺伝子の配置は、特定のヒト染色体の番号または腕が知られていない場合であっても、関連するマーカーを明らかにし得る。新規配列が、物理的マッピングによって、染色体の腕またはその一部に割り当てられ得ることが多い。これは、ポジショナル・クローニングまたは他の遺伝子発見技術を使用

10

20

30

40

50

して疾患遺伝子について精査する調査者に、有益な情報を提供する。疾患または症候群が、例えば、11q22-23へのATのように(Gattira, Nature 336巻:577~580頁(1988年))、特定のゲノム領域への遺伝子連鎖によって大まかに局在化されると、その領域への任意の配列マッピングは、さらなる調査のための関連の遺伝子または調節遺伝子を提示し得る。本発明のヌクレオチド配列は、正常個体、キャリア個体または罹患個体において、転座、逆位などに起因する染色体位置における差異を検出するためにも使用され得る。

【0144】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、全長ROS、またはFIG-ROS(S)などのROS融合ポリヌクレオチド)を検出するための全ての方法(例えば、PCRおよびFISH)は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドまたはROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するための他の方法と組み合わせられ得ることを理解すべきである。例えば、生物学的サンプルの遺伝子材料中のFIG-ROS(S)融合ポリヌクレオチド(例えば、循環腫瘍細胞中のFIG-ROS(S))の検出の後には、FIG-ROS(S)ポリヌクレオチドが実際に生物学的サンプル中でFIG-ROS(S)融合ポリペプチドとして発現されたか否かを決定するために、サンプルのタンパク質のウエスタン・ブロッティング分析または免疫組織化学(IHC)分析が続き得る。かかるウエスタン・ブロッティングまたはIHC分析は、検出されたFIG-ROS(S)ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドに特異的に結合する抗体を使用して実施され得るか、または分析は、全長FIG(例えば、タンパク質のN末端に結合する)または全長ROS(例えば、ROSのキナーゼ・ドメイン中のエピトープに結合する)のいずれかに特異的に結合する抗体を使用して実施され得る。かかるアッセイは当該分野で公知である(例えば、米国特許第7,468,252号を参照のこと)。

【0145】

別の例において、DakoのCISH技術は、同じ組織切片上で免疫組織化学と共に発色性(chromatogenic)in situハイブリダイゼーションを可能にする。CISHおよびFISHの比較については、Elliotら、Br J Biomed Sci 2008年;65巻(4号):167~171頁、2008年を参照のこと。

【0146】

本発明の別の態様は、ROSキナーゼによって駆動される肺癌または疑われる肺癌を有すると患者を診断する方法を提供する。この方法は、前記肺癌または疑われる肺癌の生物学的サンプル(このとき、生物学的サンプルは、少なくとも1つの核酸分子を含む)を、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする核酸分子、例えば全長ROSポリヌクレオチドまたはROS融合ポリヌクレオチド(例えば、FIG-ROS(S)融合ポリヌクレオチド、FIG-ROS(L)融合ポリヌクレオチド、FIG-ROS(VL)融合ポリヌクレオチド、SLC34A2-ROS(S)融合ポリヌクレオチド、SLC34A2-ROS(VS)融合ポリヌクレオチド、SLC34A2-ROS(L)融合ポリヌクレオチドもしくはCD74-ROS融合ポリヌクレオチド)にハイブリダイズするプローブと、ストリンジェントな条件下で接触させることを含み、前記生物学的サンプル中の少なくとも1つの核酸分子に対する前記プローブのハイブリダイゼーションは、前記患者を、ROSキナーゼによって駆動される肺癌または疑われる肺癌を有すると同定する。

【0147】

本発明のなお別の態様は、ROSキナーゼによって駆動される肺癌または疑われる肺癌を有すると患者を診断する方法を提供する。この方法は、前記肺癌または疑われる肺癌の生物学的サンプル(このとき、前記生物学的サンプルは、少なくとも1つのポリペプチドを含む)を、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、FIG-ROS(S)融合ポリペプチド、FIG-ROS(L)融合ポリペプチド、FIG-ROS(VL)融合ポリペプチド、SLC34A2-ROS(S)融合ポリペプチド、SLC34A2-R

10

20

30

40

50

OS (VS) 融合ポリペプチド、SLC34A2 - ROS (L) 融合ポリペプチドもしくはCD74 - ROS 融合ポリペプチド) に特異的に結合する試薬と接触させることを含み、前記生物学的サンプル中の少なくとも1つのポリペプチドに対する前記試薬の特異的結合は、前記患者を、ROSキナーゼによって駆動される肺癌または疑われる肺癌を有すると同定する。

【0148】

種々の実施形態において、肺癌または疑われる肺癌を、ROSキナーゼによって駆動されていると同定することは、その肺癌または疑われる肺癌を有するその患者を、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高いと同定する。

【0149】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えばROS融合ポリペプチド)の発現を特徴とする疾患(例えば肺癌)の診断のための基礎を提供するために、発現についての正常または標準的なプロファイルが確立され得る。これは、動物またはヒトのいずれかの正常被験体から採取した体液または細胞抽出物を、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下で、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、ROS融合ポリペプチドまたは全長ROSポリペプチド)をコードするポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントと合わせることによって達成され得る。標準的なハイブリダイゼーションは、正常被験体から得られた値を、既知の量の実質的に精製されたポリヌクレオチドが使用される実験からの値と比較することによって定量され得る。正常サンプルから得られた標準値は、疾患について症候性である患者由来のサンプルから得られた値と比較され得る。標準値と被験体値との間のずれは、疾患の存在を確立するために使用される。

【0150】

疾患が一旦確立され、処置プロトコルが開始されると、ハイブリダイゼーション・アッセイは、患者における発現のレベルが、正常患者で観察されたものに近づき始めるか否かを評価するために、定期的に反復され得る。連続アッセイから得られた結果は、数日から数カ月までの範囲の期間にわたり処置の効能を示すために使用され得る。

【0151】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの発現または活性レベルについての類似の正常または標準的プロファイルが、確立され得る。例えば、タンパク質発現について、このプロファイルは、このポリペプチドに特異的に結合する試薬を使用して確立され得、例えば、このポリペプチドに特異的に結合する(例えば、全長ROSに結合するまたはROS融合ポリペプチドの融合接合部に結合する)抗体を使用し、正常被験体における結合のレベルを肺癌について症候性の患者における結合のレベルと比較することでも、確立され得る。同様に、ROSキナーゼ活性レベルについて、標準的な*in vitro*キナーゼ・アッセイ(Ausubelら、上記; Sambrookら、上記を参照のこと)が、肺癌について症候性の患者から採取したサンプルと比較して、正常患者から採取したサンプルに対して実施され得る。

【0152】

種々の実施形態において、ROS発現またはキナーゼ活性の阻害は、ROS融合ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬、ROS融合ポリペプチドに特異的に結合する試薬、全長ROSポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬または全長ROSポリペプチドに特異的に結合する試薬を使用して決定される。いくつかのさらなる実施形態において、ROS発現またはキナーゼ活性の阻害は、全長FIGポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬、全長FIGポリペプチドに特異的に結合する試薬、全長SLC34A2ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬または全長SLC34A2ポリペプチドに特異的に結合する試薬、全長CD74ポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬または全長CD74ポリペプチドに特異的に結合する試薬を使用して決定される。

【0153】

種々の実施形態において、前記ポリペプチドの発現および/または活性は、クリゾチニブ(PF-02341066としても公知)、NVT TAE-684、AP26113

10

20

30

40

50

、CEP - 14083、CEP - 14513、CEP11988、WHI - P131およびWHI - P154からなる群から選択される治療剤を含む組成物で阻害される。

【0154】

本明細書中で使用する場合、「ROSインヒビター」または「ROS阻害性化合物」は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの発現および/または活性を直接的または間接的のいずれかで阻害する、1つまたはそれ以上の化合物、化学物質または生物物質(biological)を含む任意の組成物を意味する。かかる阻害は、in vitroでもin vivoでもよい。「ROSインヒビター治療剤」または「ROS阻害性治療剤」は、本明細書中に記載されるROSキナーゼ活性を有するポリペプチド、例えば異常に発現された全長ROSタンパク質またはROS融合ポリペプチド(例えば、FIG - ROS融合タンパク質のうち1つ)の存在を特徴とする肺癌(例えば、NSCLCまたはSCLC)を有する患者を処置するための治療剤として使用されるROS阻害性化合物を意味する。

10

【0155】

本発明のいくつかの実施形態において、ROSインヒビターは、ROS融合ポリペプチド(例えば、FIG - ROS(S)、FIG - ROS(L)、FIG - ROS(XL)、SLC34A2 - ROS(VS)、SLC34A2 - ROS(S)、SLC34A2 - ROS(L)、またはCD74 - ROS)に特異的に結合する試薬、全長ROSポリペプチドに特異的に結合する試薬、ROS融合ポリヌクレオチド(例えば、SLC34A2 - ROS(L)融合ポリヌクレオチド)を標的化するsiRNAまたは全長ROSポリヌクレオチドを標的化するsiRNAである。

20

【0156】

ROS阻害性治療剤は、キナーゼ・インヒビター、例えば小分子または抗体インヒビターなどであり得る。これは、いくつかの異なるキナーゼに対する活性を有する汎キナーゼ・インヒビターまたはキナーゼ特異的インヒビターであり得る。ROS、ALK、LTK、InsRおよびIGF1Rは、同じファミリーのチロシン・キナーゼに属するので、これらは、キナーゼ・ドメインにおいて類似の構造を共有し得る。従って、いくつかの実施形態において、本発明のROSインヒビターは、ALKキナーゼ、LTKキナーゼ、インスリン・レセプターまたはIGF1レセプターの活性もまた阻害する。ROS阻害性化合物は、以下にさらに詳細に考察される。患者の生物学的サンプルは、インヒビターによる処置の前および後に採取され、次いで、下流の基質タンパク質のリン酸化を含むROSキナーゼ活性に対するインヒビターの生物学的影響について、上記の方法を使用して分析され得る。かかる薬力学的アッセイは、最大耐容用量よりも好ましい場合がある薬物の生物学的に活性な用量を決定する際に有用であり得る。かかる情報は、薬物作用の機構を実証することによって、薬物承認のための提出においても有用である。

30

【0157】

別の実施形態において、前記ポリペプチドの発現および/または活性は、PF - 02341066、NVT TAE - 684、AP26113、CEP - 14083、CEP - 14513、CEP11988、WHI - P131およびWHI - P154からなる群から選択されるROS阻害性治療剤を含む組成物で阻害される。

40

【0158】

本発明によれば、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドは、ヒト肺癌の少なくとも1つのサブグループ中に存在し得る。従って、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドが発現される哺乳動物癌の進行は、かかる癌においてROSキナーゼの活性を阻害することによって、in vivoで阻害され得る。ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、ROS融合ポリペプチドまたは異常に発現された全長ROSポリペプチド)の発現を特徴とする癌におけるROS活性は、癌を治療有効量のROS阻害性治療剤と接触させることによって阻害され得る。従って、本発明は一部、癌(例えば腫瘍)を治療有効量のROS阻害性治療剤と接触させることによって肺癌におけるROSキナーゼの発現および/または活性を阻害することにより、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドを発

50

現する肺癌の進行を阻害する方法を提供する。

【0159】

本明細書中で使用する場合、「治療有効量」または「医薬有効量」は、癌もしくは疑われる癌の成長を減速させること、癌もしくは疑われる癌の量を低減させること、癌もしくは疑われる癌の細胞の数を低減させること、または癌を殺すことのいずれかによって、未処置の癌または疑われる癌と比較して、癌（またはその細胞）または疑われる癌（またはその細胞）を阻害するのに適した、ROS阻害性治療剤の量を意味する。

【0160】

ROS阻害性治療剤は、少なくとも1つのROSインヒビターを含む任意の組成物であり得る。かかる組成物には、単一のROS阻害性化合物のみを含む組成物、ならびに化学療法剤または一般的な転写インヒビターなどの非特異的治療剤もまた含み得る、複数の治療剤（他のRTKに対する治療剤を含む）を含む組成物もまた含まれる。

10

【0161】

いくつかの実施形態において、本発明の方法の実施において有用なROS阻害性治療剤は、標的化された小分子インヒビターである。標的化された小分子インヒビターは、酵素の触媒部位に特異的にかつしばしば不可逆的に結合すること、および/またはその活性に必要なコンフォメーションを酵素がとらないように酵素内のATP結合間隙もしくは他の結合部位に結合することによって、その標的酵素の活性を典型的に阻害する分子のクラスである。ROSキナーゼとALKキナーゼとの間の構造および機能における密接な類似性に起因して、任意のALKキナーゼ・インヒビターが、ROSキナーゼもまた阻害すると予測される。さらに、実施例で以下に記載するように、ROSキナーゼによって駆動される肺癌は、ALKキナーゼによっては駆動されない。同様に、ALKキナーゼによって駆動される肺癌は、ROSキナーゼによっては駆動されない。

20

【0162】

従って、別の態様において、本発明は、肺癌について患者を処置する方法を提供し、この方法は以下を含む：肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者の肺由来の生物学的サンプル中の、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドおよびALKキナーゼ活性を有するポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドの存在を検出する工程；ならびに有効量のALK/ROS阻害性治療剤を患者に投与し、それにより肺癌について被験体を処置する工程。

30

【0163】

さらなる態様において、本発明は、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として、肺癌を有する患者または肺癌を有すると疑われる患者を同定する方法を提供し、この方法は以下を含む：前記患者の肺由来の生物学的サンプルを、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第1の試薬およびALKキナーゼ活性を有するポリペプチドに特異的に結合する第2の試薬と接触させる工程、ならびに生物学的サンプルに対する第1の試薬または第2の試薬のいずれかの結合の検出が、ROS阻害性治療剤に応答する可能性が高い患者として患者を同定する、第1の試薬または第2の試薬が生物学的サンプルに特異的に結合するか否かを検出する工程。種々の実施形態において、第1の試薬は、全長ROSキナーゼ・タンパク質に特異的に結合する。種々の実施形態において、第2の試薬は、全長ALKキナーゼ・タンパク質に特異的に結合する。種々の実施形態において、第1の試薬は、ROSキナーゼ・タンパク質のキナーゼ・ドメインに特異的に結合する。種々の実施形態において、第2の試薬は、ALKキナーゼ・タンパク質のキナーゼ・ドメインに特異的に結合する。

40

【0164】

本明細書中で使用する場合、「ALKキナーゼ活性を有するタンパク質」は、ALKの全キナーゼ・ドメインを保持する、従って、ALKキナーゼ活性を有する任意のポリペプチドを意味する。非限定的なALKキナーゼ活性を有するポリペプチドには、全長ALK（米国特許第5,770,421号を参照のこと）、NPM-ALK、ALO17-ALK、TFG-ALK、MSN-ALK、TPM3-ALK、TPM4-ALK、ATIC

50

- ALK、MYH9 - ALK、CLTC - ALK、SEC31L1 - ALK、RANBP2 - ALK、CARS - ALK、EML4 - ALK、KIF5B - ALK、およびTFG - ALK (例えば、Palmerら、Biochem. J. 420巻(3):345~361頁、2009年(およびそこで引用される論文)、Rikovaら、Cell 131巻:1190~1203頁、2007年; Sodaら、Nature 448巻:561~566頁、2007年; Morrisら、Science 263巻:1281~1284頁、1994年; Duら、J. Mol. Med 84巻:863~875頁、2007年; Panagopoulosら、Int. J. Cancer 118巻:1181~1186頁、2006年; Coolsら、Genes Chromosomes Cancer 34巻:354~362頁、2002年; Debelenkoら、Lab. Invest. 83巻:1255~1265頁、2003年; Maら、Genes Chromosomes Cancer 37巻:98~105頁、2003年; Lawrenceら、Am. J. Pathol. 157巻:377~384頁、1995年; Hernandezら、Blood 94巻:3265~3268頁、1999年; Takeuchi K.、Clin Cancer Res. 15巻(9):3143~3149頁、2009年; Tortら、Lab. Invest. 81巻:419~426頁、2001年; Trineiraら、Cancer Res. 60巻:793~798頁、2000年; およびTouriolら、Blood 95巻:3204~3207頁、2000年を参照のこと)が含まれる。Pulfordら、Journal of Cellular Physiology、199巻:330~358頁、2004年もまた参照のこと。

10

20

【0165】

種々の実施形態において、この患者はヒトである。種々の実施形態において、肺癌は、非小細胞肺癌または小細胞肺癌である。

【0166】

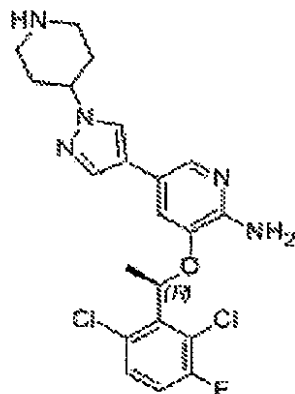
1つの有用な小分子キナーゼ・インヒビターは、Pfizer, Inc.の化合物クリゾチニブ(PF-02341066としても公知)であり、これは、ALKおよびMETのキナーゼ活性を阻害し、その特性は十分に記載されている。Youら、Cancer Res 67巻:4408頁(2007年)および米国特許公開番号2008/0300273を参照のこと。ROSを標的化し得るさらなる小分子キナーゼ・インヒビターには、TAE-684(Novartisのもの)、CH5424802(Chugai; Sakamoto, H.ら、Cancer Cell 19巻:679~690頁、2011年を参照のこと)、AP26113(Ariad Pharmaceuticals, Inc.)ならびにCEP-14083、CEP-14513およびCEP-11988(Cephalon; Wanら、Blood 107巻:1617~1623頁、2006年を参照のこと)が含まれる。

30

【0167】

PF-02341066は、構造:

【化2】

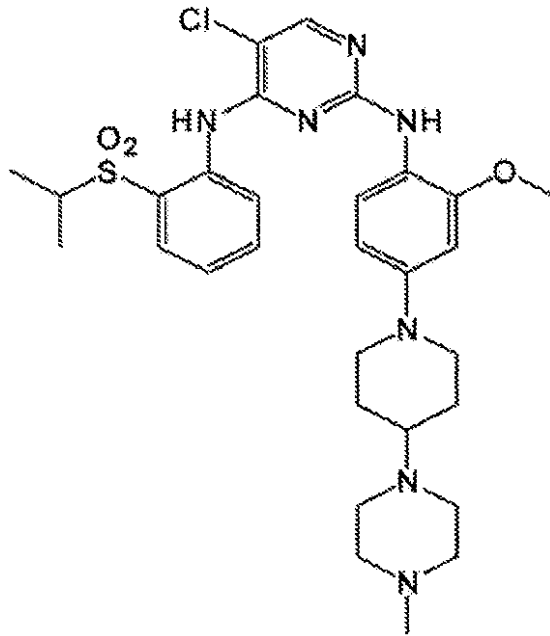


40

を有し、構造:

50

【化3】



10

を有する TAE-684、5-クロロ-2,4-ジアミノフェニルピリミジン、ROS / ALKキナーゼを阻害することが示されている。Grosinら、Proc. National Acad. Sci. 104巻(1号)270~275頁、2007年。

20

【0168】

ROSキナーゼ活性のさらなる小分子インヒビターおよび他のインヒビター(例えば、間接的インヒビター)は、X線結晶学もしくはROS三次元構造のコンピュータ・モデリングを使用して合理的に設計され得るか、またはROSキナーゼ活性の阻害を生じる重要な上流の調節酵素および/もしくは必要な結合分子の阻害に関して化合物ライブラリーをハイ・スループット・スクリーニングすることによって見出され得る。かかるアプローチは、当該分野で周知であり、記載されている。かかる治療剤によるROS阻害は、例えば、キナーゼのパネルにおいて、ROS活性は阻害するが他のキナーゼの活性は阻害しない化合物の能力を試験すること、および/または癌細胞(例えば肺癌細胞)を含む生物学的サンプルにおけるROS活性の阻害を試験することによって、確認され得る。ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドの発現/存在を特徴とする癌を阻害する化合物を同定する方法は、以下にさらに記載される。

30

【0169】

本発明の方法において有用なROS阻害性治療剤はまた、ROS活性に必要な必須の触媒部位もしくは結合部位または触媒ドメインもしくは結合ドメインに特異的に結合する、ならびにリガンド、基質または二次的な分子へのアクセスを遮断し、および/またはその活性に必要なコンフォメーションを酵素がとらないようにすることによってキナーゼを阻害する、標的化された抗体であり得る。ヒト化標的的特異的抗体の生成、スクリーニングおよび治療的使用は、十分に記載されている。Merluzziら、Adv Clin Path. 4巻(2号):77~85頁(2000年)を参照のこと。ヒト化標的的特異的阻害性抗体のハイ・スループットの生成およびスクリーニングのための、Morphosys, Inc.のHuman Combinatorial Antibody Library (HuCAL(登録商標))などの市販の技術および系が、入手可能である。

40

【0170】

種々の抗レセプター・キナーゼ標的化抗体の生成および標的化されたレセプターの活性を阻害するためのその使用は、記載されている。例えば、米国特許公開番号20040202655、米国特許公開番号20040086503、米国特許公開番号20040033543を参照のこと。レセプター・チロシン・キナーゼ活性阻害性抗体を生成および

50

使用するための標準的な方法は、当該分野で公知である。例えば、欧州特許 E P 1 4 2 3 4 2 8 号を参照のこと。

【 0 1 7 1 】

ファージ・ディスプレイ・アプローチもまた、ROS 特異的抗体インヒビターを生成するために使用され得、バクテリオファージ・ライブラリー構築および組換え抗体の選択のためのプロトコルは、周知の参考文献 CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY、Colligan ら (編)、John Wiley & Sons, Inc. (1992 ~ 2000 年)、第 17 章、セクション 17.1 中に提供されている。米国特許第 6,319,690 号、米国特許第 6,300,064 号、米国特許第 5,840,479 号および米国特許公開番号 20030219839 もまた参照のこと。

10

【 0 1 7 2 】

バクテリオファージの表面上にディスプレイされる抗体フラグメントのライブラリーが生成され得 (例えば、米国特許第 6,300,064 号を参照のこと)、本明細書中に記載される ROS 融合ポリペプチドなどの ROS キナーゼ活性を有するポリペプチドに対する結合についてスクリーニングされ得る。ROS 融合ポリペプチド (例えば、SLC34A2-ROS (S) 融合ポリペプチド) または全長 ROS ポリペプチドに特異的に結合する抗体フラグメントは、細胞中でのその融合ポリペプチドの構成的活性化を遮断するための候補分子として同定される。欧州特許 E P 1 4 2 3 4 2 8 号を参照のこと。

【 0 1 7 3 】

上記のように抗体ライブラリーのスクリーニングにおいて同定された ROS 結合性標的化抗体は、次いで、*in vitro* キナーゼ・アッセイならびに細胞株および / または腫瘍中で *in vivo* での両方において、ROS の活性を遮断するその能力についてさらにスクリーニングされ得る。ROS 阻害は、例えば、キナーゼのパネルにおいて、ROS キナーゼ活性を阻害するかかる抗体治療剤の能力を試験すること、および / または上記のように癌細胞を含む生物学的サンプルにおける ROS 活性の阻害を試験することによって、確認され得る。いくつかの実施形態において、本発明の ROS 阻害性化合物は、ROS キナーゼ活性を低減させるが、他のキナーゼのキナーゼ活性をより低い程度まで低減させる (または全くさせない)。ROS キナーゼ阻害についてかかる化合物をスクリーニングする方法は、上にさらに記載される。

20

【 0 1 7 4 】

開示された方法の実施において有用な ROS 阻害性化合物はまた、ROS キナーゼ自体以外のタンパク質または分子の活性を阻害することによって、ROS 活性を間接的に阻害する化合物であり得る。かかる阻害性治療剤は、ROS 自体をリン酸化もしくは脱リン酸化 (および従って、活性化もしくは脱活性化) するまたはリガンドの結合を妨害する重要な調節キナーゼの活性をモジュレートする、標的化されたインヒビターであり得る。他のレセプター・チロシン・キナーゼと同様、ROS は、アダプター・タンパク質および下流のキナーゼのネットワークを介した下流のシグナル伝達を調節する。結果として、ROS 活性による細胞の成長および生存の誘導は、これらの相互作用するタンパク質または下流のタンパク質を標的化することによって、阻害され得る。

30

【 0 1 7 5 】

ROS キナーゼ活性は、全長 ROS または ROS 融合ポリペプチド (例えば、CD74-ROS 融合ポリペプチド) がその活性なコンフォメーション (即ち、ROS キナーゼ・ドメインが活性化されることが可能であるように) をとるのに必要な活性化分子の結合を阻害する化合物を使用することによって、間接的にも阻害され得る。例えば、抗 PDGF 抗体の生成および使用は記載されている。米国特許公開番号 20030219839、「Anti-PDGF Antibodies and Methods for Producing Engineered Antibodies」、Bowdish らを参照のこと。レセプターに対するリガンド (PDGF) 結合の阻害は、レセプター活性を直接下方調節する。

40

【 0 1 7 6 】

50

ROS阻害性化合物または治療剤は、全長ROSまたはROS融合タンパク質をコードする遺伝子の転写を遮断することによってROSキナーゼ活性を阻害する、アンチセンスおよび/または転写阻害性化合物もまた含み得る。癌の処置のためのアンチセンス治療剤による、VEGFR、EGFRおよびIGFRおよびFGFRを含む種々のレセプター・キナーゼの阻害が、記載されている。例えば、米国特許第6,734,017号；米国特許第6,710,174号、米国特許第6,617,162号；米国特許第6,340,674号；米国特許第5,783,683号；米国特許第5,610,288号を参照のこと。

【0177】

アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、公知の技術に従って、標的遺伝子に対する治療剤として、設計、構築および使用され得る。例えば、Cohen, J., *Trends in Pharmacol. Sci.* 10巻(11号): 435~437頁(1989年)；Marcus-Sekura, *Anal. Biochem.* 172巻: 289~295頁(1988年)；Weintraub, H., *Sci. AM.* 40~46頁(1990年)；Van Der Krolら、*BioTechniques* 6巻(10号): 958~976頁(1988年)；Skorskiら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994年) 91巻: 4504~4508頁を参照のこと。EGFRのアンチセンスRNAインヒビターを使用した*in vivo*でのヒト癌腫成長の阻害が、最近記載されている。米国特許公開番号20040047847を参照のこと。同様に、哺乳動物ROS遺伝子または哺乳動物ROS融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに対する少なくとも1つのアンチセンス・オリゴヌクレオチドを含むROS阻害性治療剤は、標準的な方法に従って調製され得る。ROS阻害性アンチセンス化合物を含む医薬組成物は、以下にさらに記載するように、調製および投与され得る。

【0178】

RNA干渉のプロセスを介してROSの翻訳および従って活性を阻害する低分子干渉RNA分子(siRNA)組成物もまた、本発明の方法において望ましく使用され得る。RNA干渉、および標的タンパク質をコードするmRNAに相補的な配列を含む内因性低分子二本鎖RNA分子の導入による標的タンパク質発現の選択的サイレンシングは、十分に記載されている。例えば、米国特許公開番号20040038921、米国特許公開番号20020086356および米国特許公開20040229266を参照のこと。

【0179】

二本鎖RNA分子(dsRNA)は、RNA干渉(RNAi)として公知の高度に保存された調節機構において遺伝子発現を遮断することが示されている。簡潔に述べると、RNAse III Dicerは、dsRNAをプロセシングしておよそ22ヌクレオチドの小分子干渉RNA(siRNA)にし、これは、RNA誘導されたサイレンシング複合体RISCによる標的的特異的なmRNA切断を誘導するガイド配列として機能する(Hammondら、*Nature* (2000年) 404巻: 293~296頁を参照のこと)。RNAiは、触媒型反応を含み、それにより、新規siRNAが、より長いdsRNAの連続的切断を介して生成される。従って、アンチセンスとは異なり、RNAiは、非化学量論的様式で標的RNAを分解する。細胞または生物に投与されると、外因性dsRNAは、RNAiを介して内因性メッセンジャーRNA(mRNA)の配列特異的分解を指向することが示されている。

【0180】

哺乳動物細胞におけるそれらの発現および使用のためのベクターおよび系を含む広範な種々の標的的特異的siRNA産物は、現在市販されている。例えば、Promega, Inc. (www.promega.com)；Dharmacon, Inc. (www.dharmacon.com)を参照のこと。RNAiのためのdsRNAの設計、構築および使用についての詳細な技術マニュアルが入手可能である。例えば、Dharmaconの「RNAi Technical Reference & Application Guide」；Promegaの「RNAi: A Guide to Gene

10

20

30

40

50

「Silencing」を参照のこと。ROS阻害性siRNA産物もまた市販されており、本発明の方法において適切に使用され得る。例えば、Dharmacon, Inc., Lafayette, CO (カタログ番号M-003162-03、MU-003162-03、D-003162-07~-10 (siGENOME (商標) SMARTselect) および SMARTpool (登録商標) siRNA) を参照のこと。

【0181】

標的mRNA配列の一部に対し実質的に同一である少なくとも1つの配列を含み、一端に1~4ヌクレオチドの少なくとも1つのオーバーハングを最適に有する49ヌクレオチド長未満、好ましくは19~25ヌクレオチドの低分子dsRNAは、哺乳動物においてRNAiを媒介するのに最も有効であることが、最近確立された。米国特許公開番号20040038921および米国特許公開番号20040229266を参照のこと。かかるdsRNAの構築、およびin vivoで標的タンパク質の発現をサイレンシングするための医薬製剤におけるその使用は、かかる刊行物中に詳細に記載されている。

10

【0182】

哺乳動物において標的化される遺伝子の配列が既知である場合、例えば21~23ntのRNAが生成され得、ヒトまたは他の霊長類細胞などの哺乳動物細胞においてRNAiを媒介するその能力について試験され得る。RNAiを媒介することが示されている21~23ntのRNA分子は、所望の場合、in vivo有効性をさらに評価するために、適切な動物モデル中で試験され得る。公知の標的部位、例えば、他の核酸分子、例えばリボザイムもしくはアンチセンスを用いた研究に基づいて有効な標的部位であると決定された標的部位、または変異もしくは欠失を含む部位などの、疾患もしくは状態に関連することが既知の標的は、これらの部位を標的化するsiRNA分子を設計するために同様に使用され得る。

20

【0183】

あるいは、有効なdsRNAの配列は、例えばコンピュータ・フォールディング・アルゴリズムを使用することによって、標的部位について目的の標的mRNAをスクリーニングして、合理的に設計/予測され得る。標的配列は、カスタムPerlスクリプトまたはOligo、MacVectorもしくはGCG Wisconsin Packageなどの市販の配列分析プログラムを使用して、全てのフラグメント、または23ヌクレオチドのフラグメントなどの特定の長さの部分配列のリストへと、in silicoで分類され得る。

30

【0184】

種々のパラメータが、標的RNA配列内の最も適切な標的部位である部位がどれであるかを決定するために使用され得る。これらのパラメータには、二次もしくは三次RNA構造、標的配列のヌクレオチド塩基組成、標的配列の種々の領域間の相同性の程度、またはRNA転写物内の標的配列の相対位置が含まれるが、これらに限定されない。これらの決定に基づいて、RNA転写物内の任意の数の標的部位が、例えば、in vitro RNA切断アッセイ、細胞培養または動物モデルを使用することによって、効能についてsiRNA分子をスクリーニングするために選択され得る。例えば、米国特許公開番号20030170891を参照のこと。RNAi標的部位を同定および選択するためのアルゴリズムもまた、最近記載されている。米国特許公開番号20040236517を参照のこと。

40

【0185】

一般に使用される遺伝子移入技術には、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクションならびにウイルス法が含まれる (Grahamら(1973年) Virol. 52巻: 456頁; McCutchanら(1968年)、J. Natl. Cancer Inst. 41巻: 351頁; Churaら(1987年)、Nucl. Acids Res. 15巻: 1311頁; Fraleyら(1980年)、J. Biol. Chem. 255巻: 10431頁; Capecchi(1980年)、Cell 22巻: 479頁)。DNAはまた、カチオン性リポソーム

50

を使用して細胞中に導入され得る (Feignerら (1987年)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84巻: 7413頁)。市販のカチオン性脂質製剤には、Tfx 50 (Promega Corp., Fitchburg, WI) または Lipofectamin 200 (Life Technologies, Carlsbad, CA) が含まれる。あるいは、ウイルス・ベクターが、細胞に dsRNA を送達し、RNAi を媒介するために使用され得る。米国特許公開番号 20040023390 を参照のこと。

【0186】

哺乳動物細胞における RNAi のためのトランスフェクションおよびベクター / 発現系は、市販されており、十分に記載されている。例えば、Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO)、DharmaFECT (商標) 系; Promega, Inc.、siSTRIKE (商標) U6 Hairpin 系を参照のこと; Gouら (2003年) FEBS 548巻、113~118頁; Sui, G.ら、A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells (2002年) Proc. Natl. Acad. Sci. 99巻、5515~5520頁; Yuら (2002年) Proc. Natl. Acad. Sci. 99巻、6047~6052頁; Paul, C.ら (2002年) Nature Biotechnology 19巻、505~508頁; McManusら (2002年) RNA 8巻、842~850頁もまた参照のこと。

【0187】

調製された dsRNA 分子を使用する、哺乳動物における siRNA 干渉が次いで、dsRNA を含む医薬製剤を哺乳動物に投与することによってもたらされ得る。医薬組成物は、標的遺伝子の発現を阻害するのに十分な投薬量で投与される。dsRNA は典型的に、1日当たり体重1キログラム当たり5mg未滿の dsRNA の投薬量で投与され得、標的遺伝子の発現を阻害するまたは完全に抑制するのに充分である。一般に、dsRNA の適切な用量は、1日当たりレシピエントの体重1キログラム当たり0.01~2.5ミリグラムの範囲、好ましくは1日当たりレシピエントの体重1キログラム当たり0.1~200マイクログラムの範囲、より好ましくは1日当たり体重1キログラム当たり0.1~100マイクログラムの範囲、なおより好ましくは1日当たり体重1キログラム当たり1.0~50マイクログラムの範囲、最も好ましくは1日当たり体重1キログラム当たり1.0~25マイクログラムの範囲である。dsRNA を含む医薬組成物は、1日1回投与されるか、または例えば当該分野で周知の持効性製剤を使用して、複数のサブ用量で投与される。かかる医薬組成物の調製および投与は、以下にさらに記載されるように、標準的な技術に従って実施され得る。

【0188】

次いで、かかる dsRNA は、上記のような治療有効量のかかる dsRNA を含む医薬製剤を調製し、例えば腫瘍への直接的注射を介して、ROS キナーゼ活性を有するポリペプチドを発現する (例えば、全長 ROS タンパク質の異常な発現または ROS 融合タンパク質の発現など) 肺癌または疑われる肺癌 (例えば、NSCLC または SCLC) を有するヒト被験体に、この製剤を投与することによって、癌における ROS の発現および活性を阻害するために使用され得る。siRNA インヒビターを使用した、他のレセプター・チロシン・キナーゼ、例えば、VEGFR および EGF R の類似の阻害が、最近記載されている。米国特許公開番号 20040209832、米国特許公開番号 20030170891 および米国特許公開番号 20040175703 を参照のこと。

【0189】

本発明の方法の実施において有用な ROS 阻害性治療剤は、静脈内、筋内、腹腔内、皮下、経皮、気道 (エアロゾル)、直腸、腔内および局所 (頬側および舌下を含む) 投与を含む経口または腹腔経路を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の手段によって、哺乳動物に投与され得る。

【0190】

経口投与について、ROS阻害性治療剤は、錠剤もしくはカプセル剤の形態で、散剤もしくは顆粒剤として、または水性溶液もしくは懸濁物の形態で、一般に提供される。経口使用のための錠剤は、医薬的に許容される担体および賦形剤、例えば不活性希釈剤、崩壊剤、結合剤、滑沢剤、甘味剤、調味剤、着色剤および防腐剤などと混合された、活性成分を含み得る。適切な不活性希釈剤には、炭酸ナトリウムおよび炭酸カルシウム、リン酸ナトリウムおよびリン酸カルシウム、ならびにラクトースが含まれ、コーン・スターチおよびアルギン酸が適切な崩壊剤である。結合剤には、デンプンおよびゼラチンが含まれ得、滑沢剤は、存在する場合、一般にはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルクである。所望の場合、錠剤は、胃腸管中での吸収を遅延させるために、モノステアリン酸グリセリルまたはジステアリン酸グリセリルなどの材料でコーティングされ得る。

10

【0191】

経口使用のためのカプセル剤には、活性成分が固体希釈剤と混合されている硬ゼラチン・カプセル、および活性成分が、水、または落花生油、流動パラフィンもしくはオリーブ油などの油と混合されている軟ゼラチン・カプセルが含まれる。筋内、腹腔内、皮下および静脈内使用について、本発明の医薬組成物は、適切なpHおよび等張性に緩衝化された、無菌の水性溶液または水性懸濁物で一般に提供される。適切な水性ビヒクルには、リンゲル溶液および等張塩化ナトリウムが含まれる。担体は、水性緩衝剤から排他的になり得る（「排他的に」とは、ROS阻害性治療剤の取り込みに影響を与え得るまたは取り込みを媒介し得る補助剤もカプセル化物質も存在しないことを意味する）。かかる物質には、例えば、以下に記載されるような、ミセル構造、例えば、リポソームまたはカプシドが含まれる。水性懸濁物には、セルロース誘導体、アルギン酸ナトリウム、ポリビニル-ピロリドンおよびトラガカント・ゴムなどの懸濁化剤、ならびにレクチンなどの湿潤剤が含まれ得る。水性懸濁物に適した防腐剤には、p-ヒドロキシ安息香酸エチルおよびp-ヒドロキシ安息香酸n-プロピルが含まれる。

20

【0192】

ROS阻害性治療剤組成物には、身体からの迅速な排出に対して治療剤（例えば、dsRNA化合物、またはROS融合ポリペプチドに特異的に結合する抗体）を保護するカプセル化製剤、例えば、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む徐放性製剤も含まれ得る。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの、生分解性の生体適合性ポリマーが使用され得る。かかる製剤の調製のための方法は、当業者に明らかである。材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc. から市販でも得られ得る。リポソーム懸濁物（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化されたリポソームを含む）もまた、医薬的に許容される担体として使用され得る。これらは、例えば、米国特許第4,522,811号；PCT公開WO91/06309；および欧州特許公開EP-A-43075中に記載されるような、当業者に公知の方法に従って調製され得る。カプセル化製剤は、ウイルス・コート・タンパク質を含み得る。ウイルス・コート・タンパク質は、ポリオーマ・ウイルスなどのウイルスから誘導され得るもしくはウイルスに関連し得るか、または部分的もしくは全体的に人工であり得る。例えば、コート・タンパク質は、ポリオーマ・ウイルスのVirus Protein 1および/もしくはVirus Protein 2、またはそれらの誘導体であり得る。

30

40

【0193】

ROS阻害性治療剤は、被験体への投与のためのリポソーム、担体および希釈剤ならびにそれらの塩を含む送達ビヒクルもまた含み得、および/または医薬的に許容される製剤中に存在し得る。例えば、核酸分子の送達方法は、Akhtarら、1992年、Trends Cell Bio.、2巻、139頁；DELIVERY STRATEGIES FOR ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE THERAPEUTICS、編、Akhtar、1995年、Maurerら、1999年、Mol. Me

50

mbr. Biol., 16巻、129~140頁; HoflandおよびHuang, 1999年、Handb. Exp. Pharmacol., 137巻、165~192頁; ならびにLeeら、2000年、ACS Symp. Ser., 752巻、184~192頁に記載されている。米国特許第6,395,713号およびPCT公開番号WO94/02595はさらに、核酸分子の送達のための一般的な方法を記載している。これらのプロトコルは、実質的に任意の核酸分子の送達のために利用され得る。

【0194】

ROS阻害性治療剤(即ち、治療剤として投与されるROS阻害性化合物)は、リポソーム中でのカプセル化、イオントフォレーシスによるもの、またはヒドロゲル、シクロデキストリン、生分解性ナノカプセルおよび生体接着マイクロスフェアなどの他のビヒクル中への取り込みによるもの、またはタンパク質性ベクターによるものが含まれるがこれらに限定されない、当業者に公知の種々の方法によって、哺乳動物腫瘍に投与され得る(PCT公開番号WO00/53722を参照のこと)。あるいは、治療剤/ビヒクルの併用が、直接的注射または注入ポンプの使用によって局所的に送達される。組成物の直接的注射は、皮下であれ筋内であれ皮内であれ、標準的な針およびシリンジ方法論を使用して、またはConryら、1999年、Clin. Cancer Res., 5巻、2330~2337頁およびPCT公開番号WO99/31262に記載される技術などの針なしの技術によって、行われ得る。

【0195】

ROSインヒビター治療剤の医薬的に許容される製剤は、上記化合物の塩、例えば、酸付加塩、例えば、塩酸、臭化水素酸、酢酸およびベンゼンスルホン酸の塩を含む。医薬組成物または製剤とは、細胞または例えばヒトを含む患者中への、全身投与などの投与に適した形態の、組成物または製剤をいう。適切な形態は一部、使用、または経口、経皮もしくは注射によるなどの進入の経路に依存する。かかる形態は、その組成物または製剤が標的細胞に達するのを防いでではない。例えば、血流中に注射される医薬組成物は、可溶性でなければならない。他の因子が当該分野で公知であり、毒性などの考慮事項およびその組成物または製剤がその効果を発揮するのを防ぐ形態を含む。

【0196】

全身吸収(例えば、全身吸収または血流中の薬物の蓄積とその後の身体全体での分布)を導く投与経路が望ましく、これには以下が含まれるがこれらに限定されない: 静脈内、皮下、腹腔内、吸入、経口、肺内および筋内。これらの投与経路の各々は、接近可能な罹患組織または腫瘍にROS阻害性治療剤を曝露させる。循環中への薬物の進入の速度は、分子量またはサイズの関数であることが示されている。本発明の化合物を含むリポソームまたは他の薬物キャリアの使用は、例えば、特定の組織型、例えば網状内皮系(reticular endothelial system)(RES)の組織において薬物を潜在的に局在化させ得る。薬物とリンパ球およびマクロファージなどの細胞の表面との会合を促進し得るリポソーム製剤もまた、有用である。このアプローチは、癌細胞などの異常な細胞のマクロファージおよびリンパ球免疫認識の特異性を利用することによって、標的細胞への薬物の増強された送達を提供し得る。

【0197】

「医薬的に許容される製剤」とは、それらの所望の活性に最も適した物理的位置における本発明の核酸分子の有効な分布を可能にする組成物または製剤を意味する。本発明の核酸分子を用いた製剤に適した薬剤の非限定的な例には、以下が含まれる: CNS中への薬物の進入を増強し得るP-糖タンパク質インヒビター(例えばPluronic P85)(Jolliet-RiantおよびTillement, 1999年、Fundam. Clin. Pharmacol., 13巻、16~26頁); 生分解性ポリマー、例えば脳内移植後の持効性送達のためのポリ(DL-ラクチド-コグリコリド)マイクロスフェア(Emerichら、1999年、Cell Transplant, 8巻、47~58頁)(Rosermes, Inc. Cambridge, Mass.); ならびに例えば、血液脳関門を横切って薬物を送達し得、ニューロン取り込み機構を変更し得る、ポリ

10

20

30

40

50

ブチルシアノアクリレート製の、充填されたナノ粒子 (Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry、23巻、941~949頁、1999年)。本発明の方法において有用なROS阻害性化合物のための送達ストラテジーの他の非限定的な例には、Boadoら、1998年、J. Pharm. Sci.、87巻、1308~1315頁; Tylerら、1999年、FEBS Lett.、421巻、280~284頁; Pardridgeら、1995年、PNAS USA.、92巻、5592~5596頁; Boado、1995年、Adv. Drug Delivery Rev.、15巻、73~107頁; Aldrian-Herradaら、1998年、Nucleic Acids Res.、26巻、4910~4916頁; および Tylerら、1999年、PNAS USA.、96巻、7053~7058頁に記載された材料が含まれる。

10

【0198】

ポリ(エチレングリコール)脂質を含む表面改変されたリポソーム(PEG改変された、または長期循環型リポソームもしくはステルス・リポソーム)を含む治療組成物もまた、本発明の方法において適切に使用され得る。これらの製剤は、標的組織における薬物の蓄積を増加させる方法を提供する。このクラスの薬物担体は、オプソニン化および単核食細胞系(MPSまたはRES)による排除に耐え、それにより、より長い血液循環時間およびカプセル化された薬物への増強された組織曝露を可能にする(Lasicら、Chem. Rev. 1995年、95巻、2601~2627頁; Ishiwataら、Chem. Pharm. Bull. 1995年、43巻、1005~1011頁)。かかるリポソームは、おそらく血管新生した標的組織における血管外漏出および捕捉によって、腫瘍中に選択的に蓄積することが示されている(Lasicら、Science 1995年、267巻、1275~1276頁; Okuら、1995年、Biochim. Biophys. Acta、1238巻、86~90頁)。長期循環型リポソームは、特にMPSの組織中に蓄積することが公知の従来のカチオン性リポソームと比較して、DNAおよびRNAの薬物動態および薬力学を増強する(Liuら、J. Biol. Chem. 1995年、42巻、24864~24870頁; PCT公開番号WO96/10391; PCT公開番号WO96/10390; およびPCT公開番号WO96/10392)。長期循環型リポソームはまた、肝臓および脾臓などの代謝的に活動的なMPS組織中での蓄積を回避するその能力に基づいて、カチオン性リポソームと比較してより高い程度まで、ヌクレアーゼ分解から薬物を保護する可能性が高い。

20

30

【0199】

治療組成物は、医薬的に許容される担体または希釈剤中に医薬有効量の所望の化合物を含み得る。治療的使用に許容可能な担体または希釈剤は、製薬分野で周知であり、例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro編、1985年)中に記載されている。例えば、防腐剤、安定剤、色素および調味剤が提供され得る。これらには、安息香酸ナトリウム、ソルビン酸、およびp-ヒドロキシ安息香酸のエステルが含まれる。さらに、抗酸化剤および懸濁剤が使用され得る。

【0200】

いくつかの実施形態において、ROS阻害性治療剤および/またはALK/ROS阻害性治療剤は、有効量で投与される。「有効量」または「有効用量」とは、疾患状態(例えば肺癌)を予防、その発生を阻害、またはそれを処置(ある程度まで症状を、好ましくは全ての症状を緩和)するために必要な治療剤の量を意味する。有効用量は、疾患の型、使用される治療剤、投与経路、処置される哺乳動物の型、考慮される特定の哺乳動物の肉体的特徴、同時の薬物適用、および医療分野の当業者が認識する他の因子に依存する。一般に、有効量は、0.1mg/kg体重/日と100mg/kg体重/日の間の量の活性成分であり、負に荷電したポリマーの効力に依存して投与される。

40

【0201】

1日当たり体重1キログラム当たり約0.1mg~約140mgのオーダーの投薬量レ

50

ベルが、上記状態の処置において有用である（1日当たり患者1人当たり約0.5mg～約7g）。単一の投薬形態を生成するために担体材料と併用され得る活性成分の量は、処置される宿主および投与の特定の様式に依存して変動する。投薬単位形態は一般に、約1mg～約500mgの間の活性成分を含む。任意の特定の患者についての特定の用量レベルは、使用される特定の化合物の活性、年齢、体重、全般的健康、性別、食餌、投与の時間、投与経路および排泄の速度、薬物併用、ならびに治療を受けている特定の疾患の重症度を含む、種々の因子に依存することが理解される。

【0202】

非ヒト動物への投与について、組成物はまた、動物の餌または飲用水に添加され得る。動物が、その食餌と共に治療的に適切な量で組成物を摂取するように、動物の餌および飲用水組成物を製剤化することが簡便であり得る。餌または飲用水への添加のためのプレミックスとして組成物を提示することもまた簡便であり得る。

10

【0203】

本発明の実施において有用なROS阻害性治療剤は、上記のような単一化合物、または同じクラスのインヒビター（例えば、抗体インヒビター）であれ異なるクラス（例えば、抗体インヒビターおよび低分子インヒビター）であれ複数の化合物の併用を含み得る。化合物のかかる併用は、融合タンパク質発現癌の進行を阻害する際の全体的な治療効果を増加させ得る。例えば、治療組成物は、低分子インヒビター、例えばPfizer, Inc.製のクリゾチニブ（PF-02341066としても公知）（米国公開番号2008/0300273を参照のこと）単独であり得るか、またはROS活性を標的化する他のクリゾチニブ・アナログおよび/もしくはROSの小分子インヒビター、例えばNovartis, Inc.製のNVP-TAE684もしくはSakamotoら、Cancer Cell 19巻：679～690頁、2011年に記載されたCH5424802化合物との併用であり得る。治療組成物は、1つまたはそれ以上の標的化されたインヒビターに加えて、1つまたはそれ以上の非特異的薬物療法剤もまた含み得る。かかる併用は、多くの癌において相乗的腫瘍殺傷効果を提供することが最近示されている。ROS活性および腫瘍成長をin vivoで阻害する際のかかる併用の有効性は、以下に記載されるように評価され得る。

20

【0204】

本発明はまた、その化合物が、癌におけるポリペプチドのROSキナーゼ活性を阻害するか否かを決定することによって、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドまたはそれをコードするポリヌクレオチドを特徴とする癌（例えば肺癌）の進行を化合物が阻害するか否かを決定する方法を、一部提供する。いくつかの実施形態において、ROSの活性の阻害は、骨髄、血液または腫瘍由来の細胞を含む生物学的サンプルを試験することによって決定される。別の実施形態において、ROSの活性の阻害は、ROSポリペプチドに特異的に結合する試薬（例えば、ROS特異的抗体）またはROSポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに特異的に結合する試薬（例えば、siRNAまたはROSアンチセンス）を少なくともも使用して決定される。

30

【0205】

試験された化合物は、上記のような任意の型の治療剤または組成物であり得る。in vitroおよびin vivoの両方で化合物の効能を評価する方法は、充分確立されており、当該分野で公知である。例えば、組成物は、ROSキナーゼが活性化される細胞または細胞抽出物を使用して、in vitroでROSを阻害する能力について試験され得る。化合物のパネルは、ROSに対する化合物の特異性を試験するために使用される（EGFRまたはPDGFRなどの他の標的とは逆に）。

40

【0206】

使用され得る薬物スクリーニングのための別の技術は、PCT公開番号WO84/03564中に記載されるような、目的のタンパク質に対する適切な結合親和性を有する化合物のハイ・スループット・スクリーニングを提供する。この方法において、ROS活性を有するポリペプチド（例えば、全長ROSタンパク質、または複数のROS融合タンパク

50

質のうち1つ)に適用される場合、多数の異なる低分子試験化合物が、プラスチック・ピンまたはある種の他の表面などの固体基材上で合成される。試験化合物を、本発明のポリペプチドまたはそのフラグメントと反応させ、洗浄する。結合したポリペプチド(例えば、SLC34A2-ROS(VS)、SLC34A2-ROS(S)、SLC34A2-ROS(L)、CD74-ROS、FIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)もしくはFIG-ROS(XL)融合ポリペプチドまたは全長ROSポリペプチド)が次いで、当該分野で周知の方法によって検出される。精製されたポリペプチドはまた、上述の薬物スクリーニング技術における使用のために、プレート上に直接コーティングされ得る。あるいは、非中和抗体が、ペプチドを捕捉し、固体支持体上にそのペプチドを固定化するために使用され得る。

10

【0207】

*in vitro*でのROS活性の有効なインヒビターであることが見出された化合物は次いで、例えば、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチドを発現するヒト肺、肝臓、膵臓、腎臓、肺または結腸の腫瘍を有している哺乳動物異種移植片を使用して、キナーゼ活性を有するポリペプチドを発現する癌(例えば、肺癌、または肝臓癌、肺癌、結腸癌、腎臓癌もしくは膵臓癌などの他の癌)の進行を*in vivo*で阻害するその能力について、試験され得る。この手順において、ROSキナーゼ活性を有するタンパク質(例えば、全長ROS、またはROS融合タンパク質のうち1つ)を発現することが公知の癌細胞株は、動物(例えば、ヌード・マウスもしくはSCIDマウス、または他の免疫無防備動物)中で皮下に配置され得る。次いで細胞は、視覚的にモニタリングされ得る腫瘍塊へと成長する。次いで動物は、薬物で処置され得る。腫瘍サイズに対する薬物処置の効果は、外側から観察され得る。次いで動物は屠殺され、IHCおよびウエスタン・ブロットによる分析のために腫瘍が取り出される。同様に、哺乳動物骨髄移植片が、ROSキナーゼ活性を有するタンパク質を発現する血液腫瘍における薬物応答を試験するために、標準的な方法によって調製され得る。この方法で、薬物の効果は、患者と最も密接に類似している生物学的設定で観察され得る。腫瘍細胞または周辺の間質細胞においてシグナル伝達を変更する薬物の能力は、リン酸化特異的抗体を用いた分析によって決定され得る。細胞死または細胞増殖の阻害を誘導することにおける薬物の有効性は、切断されたカスパーゼ3および切断されたPARPなどのアポトーシス特異的マーカーを用いた分析によっても、観察され得る。

20

30

【0208】

かかる化合物の毒性および治療効能は、例えば、LD50(集団の50%にとって致死の用量)およびED50(集団の50%において治療的に有効な用量)を決定するために、細胞培養または実験動物において標準的な製薬上の手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果の間の用量比率は、治療指数であり、比率LD50/ED50として表され得る。いくつかの実施形態において、化合物は高い治療指数を示す。

【0209】

ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(またはそれをコードするポリヌクレオチド)の存在を特徴とする腫瘍の進行を化合物が阻害するか否かを決定するための開示された方法を実施する際には、哺乳動物異種移植片(または骨髄移植片)由来の細胞を含む生物学的サンプルもまた、有利に使用され得る。非限定的な異種移植片(または移植片レシピエント)は、ROSキナーゼ活性を有するポリペプチド(例えば、ROS融合ポリペプチド(例えば、CD74-ROSもしくはFIG-ROS(S))または全長ROS)を発現するヒト腫瘍(または白血病)を有する、マウスなどの小型哺乳動物である。ヒト腫瘍を有する異種移植片は、当該分野で周知であり(Kal, Cancer Treat Res, 72巻:155~69頁(1995年)を参照のこと)、ヒト腫瘍を有する哺乳動物異種移植片の生成は、十分に記載されている(Winogradら、In Vivo, 1巻(1号):1~13頁(1987年)を参照のこと)。同様に、骨髄移植モデルの生成および使用は、十分に記載されている。(例えば、Schwallerら、EMBO J, 17巻:5321~333頁(1998年); Kellyら、Blood 99巻:

40

50

310～318頁(2002年)を参照のこと)。

【0210】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するためだけに提供され、添付の特許請求の範囲に提供された場合を除き、本発明の範囲を限定する意図はない。本発明は、当業者に明らか、本発明中に教示された方法の改変およびバリエーションを包含する。言及がなされる材料、試薬などは、特に示さない限り、商業的供給源から得られ得る。

【0211】

〔実施例1〕

グローバル・ホスホペプチド・プロファイリングによる、NSCLC細胞株におけるROSキナーゼ活性の同定

HCC78を含むいくつかのヒトNSCLC細胞株におけるキナーゼ活性化のグローバル・リン酸化プロファイルを、複雑な混合物由来の改変されたペプチドの単離および質量分析的特徴付けのためのIAP技術を使用して試験した(米国特許第7,300,753号および米国特許第7,198,896号を参照のこと)。IAP技術を、ホスホチロシン特異的抗体(CELL SIGNALING TECHNOLOGY, INC.、Denver、MAから市販される、カタログ番号9411)を使用して実施して、NSCLC細胞株の抽出物由来のホスホチロシン含有ペプチドを単離し、引き続いて特徴付けた。

【0212】

具体的には、この疾患の新規駆動体を同定するために、IAPアプローチを使用して、NSCLC細胞株における活性化されたチロシン・キナーゼの同定を促進した。

【0213】

細胞培養

HCC78細胞を、DSMZ(German National Resource Centre for Biological Material)から得て、10%胎仔ウシ血清(FBS)(Sigma)を含むRPMI-1640培地(Invitrogen)中で成長させた。

【0214】

ホスホペプチド免疫沈降

合計 2×10^8 細胞を、 1.25×10^8 細胞/mlで尿素溶解緩衝液(20mM HEPES pH8.0、9M尿素、1mMバナジン酸ナトリウム、2.5mMピロリン酸ナトリウム、1mM -グリセロホスフェート)中で溶解し、超音波処理した。超音波処理した溶解物を、20,000×gでの遠心分離によって清澄化し、タンパク質を、以前に記載されたように(Rushら、Nat. Biotechnol. 23巻(1号):94~101頁(2005年)を参照のこと)、還元シアルキル化した。サンプルを、20mM HEPES pH8.0で希釈して、最終尿素濃度2Mにした。トリプシン(0.001M HCl中1mg/ml)を、清澄化した溶解物に1:100v/vで添加した。サンプルを、室温で一晩消化した。

【0215】

消化後、溶解物を酸性化して、1%TFAの最終濃度にした。ペプチド精製を、以前に記載されたように(Rushら、上記を参照のこと)、Sep-Pak C₁₈カラムを使用して実施した。精製後、全ての溶出物(0.1%TFA中、8%、12%、15%、18%、22%、25%、30%、35%および40%のアセトニトリル)を合わせ、凍結乾燥した。乾燥したペプチドを、1.4mlのMOPS緩衝液(50mM MOPS/NaOH pH7.2、10mM Na₂HPO₄、50mM NaCl)中に再懸濁し、不溶性材料を、12,000×gで10分間の遠心分離によって除去した。

【0216】

腹水由来のホスホチロシン・モノクローナル抗体P-Tyr-100(Cell Signaling Technology)を、4mg/mlペースで、プロテインGアガロース・ペース(Roche)に、非共有結合により4で一晩カップリングした。カップリング後、抗体-樹脂を、PBSで2回洗浄し、MOPS緩衝液で3回洗浄した。固定

10

20

30

40

50

された抗体 (40 μ l、160 μ g) を、MOPS IP 緩衝液中の 1 : 1 スラリーとして、可溶化したペプチド画分に添加し、この混合物を 4 で一晩インキュベートした。固定化した抗体ビーズを、MOPS 緩衝液で 3 回洗浄し、ddH₂O で 2 回洗浄した。ペプチドを、40 μ l の 0.15% TFA とのそれぞれ 20 分間のインキュベーションによってビーズから 2 回溶出させ、画分を合わせた。

【0217】

LC-MS/MS 質量分析による分析

IP 溶離液 (40 μ l) 中のペプチドを、Stop and Go 抽出チップ (Stage Tips) を使用して、溶出した抗体から濃縮および分離した (Rappsilberら、Anal. Chem.、75 巻 (3 号) : 663 ~ 70 頁 (2003 年) を参照のこと)。ペプチドを、1 μ l の 60% MeCN、0.1% TFA を用いて、マイクロカラムから、7.6 μ l の 0.4% 酢酸 / 0.005% ペンタフルオロ酪酸 (HFBA) 中に溶出させた。サンプルを、不活性サンプル注入バルブを備えた Famos オートサンプラー (Dionex) を使用して、Magic C18 AQ 逆相樹脂 (Michrom Bioresources) を充填した 10 cm x 75 μ m PicoFrit キャピラリー・カラム (New Objective) 上にロードした。カラムを、280 nl / 分で送達した 0.4% 酢酸、0.005% HFBA 中のアセトニトリルの 45 分の直線勾配で展開した (Ultimate、Dionex)。

10

【0218】

タンデム質量スペクトルを、トップ・フォー (top-four) 法、動的排除反復カウント (dynamic exclusion repeat count) 1 および 0.5 分の反復持続時間 (repeat duration) を使用して、LCQ Deca XP Plus イオン・トラップ質量分析器 (ThermoFinnigan) でデータ依存的様式で収集した。

20

【0219】

データベース分析および割り当て

MS/MS スペクトルを、TurboSequest (ThermoFinnigan) (BioWorks 3.0 の一部として供給される Sequest Browser パッケージ (v. 2.7、rev. 1.2) 中) を使用して評価した。個々の MS/MS スペクトルを、以下の設定を用いて、Sequest Browser プログラム Create Data を使用して生データ・ファイルから抽出した：ボトム MW、700；トップ MW、4,500；イオンの最小数、20；最小 TIC、 4×10^5 ；および前駆体荷電状態、不特定。スペクトルを、サンプル注入の前の生データ・ファイルの始めから、溶出勾配の最後まで抽出した。IonQuest および Vudta プログラムは、Sequest 分析のために MS/MS スペクトルをさらに選択するためには使用しなかった。MS/MS スペクトルを、以下の TurboSequest パラメータを用いて評価した：ペプチド質量許容差 (tolerance)、2.5；フラグメント・イオン許容差、0.0；改変当たりの差別的アミノ酸の最大数、4；質量タイプ・ペアレント (mass type parent)、平均；質量タイプ・フラグメント、平均；内部切断部位の最大数、10；b イオンおよび y イオンからの水およびアンモニアの中性的損失を、相関分析において考慮した。エラストラーゼ消化物から収集したスペクトルを除いて、タンパク質分解酵素を特定した。

30

40

【0220】

動的改変として酸化メチオニン (M+16) およびリン酸化 (Y+80) を許容する 27,175 のタンパク質を含む、2004 年 8 月 24 日にリリースされた NCBI ヒト・データベースに対して、検索を行った。

【0221】

プロテオミクス研究において、タンパク質が実際にサンプル中に存在することを示すために、1 つの実験結果における単一のペプチドの観察のみに基づいてタンパク質の同定を認証することが望ましい。これは、以下の実施例に記載される、未だ普遍的には受け入れ

50

られていないペプチド割り当てを認証するための統計学的方法と、タンパク質およびペプチドの同定結果の公開のためのガイドラインとの開発を導いている (Carrrら、Mol Cell Proteomics 3巻: 531~533頁(2004年)を参照のこと)。しかし、免疫親和性戦略は、リン酸化されていないペプチドからリン酸化されたペプチドを分離するので、タンパク質由来のたった1つのホスホペプチドを観察することは一般的な結果であり、これは、多くのリン酸化されたタンパク質が、たった1つのチロシン・リン酸化部位を有するためである。

【0222】

この理由のために、ホスホペプチド割り当てを認証するためのさらなる基準を使用することが適切である。これらのさらなる基準のいずれかが満たされる場合、割り当ては正確である可能性が高い: (i) MS/MSスペクトルは、荷電状態と共に顕著に変化するので、同じ配列が、異なる荷電状態を有する同時溶出イオンに割り当てられる; (ii) 不完全なタンパク質分解またはトリプシン以外のプロテアーゼの使用に由来する配列重複に起因して、1つより多いペプチド配列コンテキストにおいて部位が見出される; (iii) 相同ではあるが同一ではないタンパク質アイソフォームに起因して、1つより多いペプチド配列コンテキストにおいて部位が見出される; (iv) 種間の相同ではあるが同一ではないタンパク質に起因して、1つより多いペプチド配列コンテキストで部位が見出される; および (v) イオン・トラップ質量分析器が再現性の高いMS/MSスペクトルを生じるので、割り当てられた配列に対応する合成ホスホペプチドのMS/MS分析によって部位が認証される。最後の基準は、特に目的とされる新規部位の割り当てを確認するために、慣用的に使用される。

【0223】

全てのスペクトルおよびSequestにより行った全ての配列割り当てを、リレーションナル・データベース中にインポートした。割り当てられた配列を、保守的な2工程プロセスに従って、許容または排斥した。第1の工程において、ハイスコアの配列割り当てのサブセットを、+1の荷電状態について少なくとも1.5、+2の荷電状態について2.2および+3の荷電状態について3.3のXCORR値についてフィルタリングし、10の最大RSP値を許容することによって、選択した。以下の基準のいずれかが満足された場合に、このサブセット中の割り当てを排斥した: (i) このスペクトルは、a、bもしくはyイオンとして、bもしくはyイオンからの水またはアンモニアの中性的損失から生じるイオンとして、もしくは多重プロトン化したイオンとして割り当てられた配列にマッピングされ得ない、少なくとも1つの主要ピーク(スペクトル中の最も強いイオンの少なくとも10%の強度)を含んだ; (ii) スペクトルは、少なくとも6つの中断されていない残基と等価な一連のbもしくはyイオンを含まなかった; または (iii) 配列は、本発明者らが実施した全ての研究において少なくとも5回は観察されることがなかった(不完全なタンパク質分解またはトリプシン以外のプロテアーゼの使用に起因して重複する配列を除く)。第2の工程において、低スコア・スペクトルが、別の研究において収集された高スコア・スペクトルに対する高い程度の類似性を示した場合に、閾値を下回るスコアを有する割り当てを許容したが、これは、真の参照ライブラリー検索戦略をシミュレートする。割り当てられた配列の最終的なリストを支持する全てのスペクトル(本明細書には示さない)を、少なくとも3人の科学者が審査して、その信頼性を確立した。

【0224】

上記IAP分析により、HCC78細胞から、454の非冗長ホスホチロシン含有ペプチド、395のホスホチロシン部位および240のチロシン・リン酸化タンパク質が同定され、その大部分は新規であった(データ示さず)。ROSKINASEを含めて、検出されたチロシン・リン酸化キナーゼのうちいくつかは、他のNSCLC細胞株におけるMS分析によって通常検出されないものであった(未公開のデータ)。

【0225】

〔実施例2〕

グローバル・ホスホペプチド・プロファイリングを使用した、ヒト癌サンプルにおける

変異体ROSキナーゼ発現の検出

ヒトNSCLCにおけるROS融合変異の発生率をさらに確認するために、上記のグローバル・ホスホペプチド・プロファイリングのIAP技術(実施例1を参照のこと)を使用して、いくつかのヒトNSCLC腫瘍を試験して、これらの腫瘍中のROSホスホペプチドを同定した。腫瘍サンプル(解剖した腫瘍を液体窒素中で瞬間的に凍結させ、維持した)は、China(Second Xiangya Hospital, Central South University Changsha, Hunan, P.R.China)の臨床共同研究者から得た。

【0226】

簡潔に述べると、約300ミリグラム~500ミリグラムの間の腫瘍組織をホモジナイズした。例えば、組織を、 1.25×10^8 細胞/mlで尿素溶解緩衝液(20mM HEPES pH8.0、9M尿素、1mMバナジン酸ナトリウム、2.5mMピロリン酸ナトリウム、1mM -グリセロホスフェート)中でホモジナイズおよび溶解し、超音波処理した。超音波処理した溶解物を、20,000×gでの遠心分離によって清澄化し、タンパク質を、以前に記載されたように(Rushら、Nat. Biotechnol. 23巻(1号):94~101頁(2005年)を参照のこと)、還元しアルキル化した。サンプルを、20mM HEPES pH8.0で希釈して、最終尿素濃度2Mにした。トリプシン(0.001M HCl中1mg/ml)を、清澄化した溶解物に1:100v/vで添加した。サンプルを、室温で一晩消化した。

【0227】

これらのサンプルのグローバル・ホスホチロシン・プロファイリングを、上記実施例1に記載されるように実施した。プロファイリングの結果により、腫瘍サンプルの1つが、ROSホスホ-ペプチドおよびSLC34A2ホスホ-ペプチドの両方を有し(以下の表1を参照のこと(他の検出されたホスホペプチドは示さない))、IRS-1およびIRS-2ホスホペプチドなどの下流の分子もまた有することが示された。この腫瘍のチロシン・プロファイリング・シグネチャーは、予測されるように、NSCLC細胞株HCC78のものと非常に類似していた(表3を参照のこと)。FISH分析は、この腫瘍がROS転座を有することもまた示した(以下の実施例10を参照のこと)。RT-PCR、DNA配列決定アッセイを使用して、この患者(およびROS転座を有する他の患者)におけるROS活性がSLC34A2/ROSの異常な転写物に起因することをさらに確認することができる。

【0228】

10

20

30

【表3】

表3. ヒト NSCLC 腫瘍のホスホペプチド・プロファイリング

名称	アクセッション	部位	ペプチド	配列番号	HCC78 (細胞株)	cs042 (腫瘍)	
ROS	P08922	1923	GLAAGVGLANACyAIHTLPTQEEI ENLPAFPR	35 36; 37	1	1	
ROS	P08922	2110	DIyKNDyYR; DIyKNDyYR; DIyKNDyYR;		12	4	
ROS	P08922	2114	DIyKNDyYR; DIyKNDyYR; DIyKNDyYR;	36; 37	11	3	10
ROS	P08922	2115	DIyKNDyYR; DIyKNDyYR; EGLNyMVLATECGQGEEK; NREGLNyMVLATECGQGEEK; EGLNyMVLATECGQGEEKSEGPL GSQESESCGLR;	37 38; 39; 40; 41	1	1	
ROS	P08922	2274	NREGLNyMVLATECGQGEEKSEG PLGSQESESCGLR		20		
ROS	P08922	2323	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD; QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyG DGSD; QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGYG DGSD	42	4	1	20
ROS	P08922	2334	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYG DGSD; QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGyG DGSD; QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGYG DGSD	42	7	2	
ROS	P08922	2342	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyG DGSD		3		
IRS-1	P35568	612	GGHHRPDSSTLHTDDGyMPMSPG VAPVPSGR	43		1	30
IRS-1	P35568	632	KGSGDyMPMSPK VDPNGyMMMSPSGGCSPDIGGGP	44 45	2	1	
IRS-1	P35568	662	SSSSSSNAVPSGTSYGK	46	3		
IRS-2	Q9Y4H2	598	QRPVPQSSASLDEyTLMR SSSSNLGADDGyMPMTPGAALAG	46 47		1	
IRS-2	Q9Y4H2	653	SGSGSCR	48	4	5	
IRS-2	Q9Y4H2	675	SDDyMPMSPASVSAPK	49	3	4	
IRS-2	Q9Y4H2	742	ASSPAESSPEDSGyMR APYTCCGDSQyVLMSSPVGR; SYKAPYTCCGDSQyVLMSSPVG R	50	3	3	
IRS-2 SLC34A 2	Q9Y4H2 O95436	823 54	IELLPSySTATLIDEPTVDDPWNL PTLQDSGIK	51	2 1	5 1	40

【0229】

〔実施例3〕

NSCLC細胞株におけるROSキナーゼ発現のウエスタン・プロット分析

他のNSCLC細胞株ではなくHCC78 NSCLC細胞株が、活性化されたROSキナーゼを発現するという観察は、ROSおよび他のレセプター・チロシン・キナーゼ(RTK)ならびに下流のキナーゼに特異的な抗体を使用して、細胞抽出物のウエスタン・プロット分析によって確認した。

【0230】

HCC78細胞を、Protease Arrest (商標) (G Biosciences) を補充した1×細胞溶解緩衝液 (Cell Signaling Technology) 中で溶解し、電気泳動によって分離した。イムノブロットイングのための全ての抗体および試薬は、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA) のものであった。ウエスタン・ブロットイングを、「Western Immunoblotting Protocol」(Cell Signaling Technology, Inc., 2005年~2006年のカタログ) に記載のように実施した。抗ROS抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. から得た。

【0231】

10

図1は、ウエスタン・プロットの結果を示す。多数の異なるNSCLC細胞株のうち、HCC78のみがROSタンパク質を発現する。HCC78中のROSタンパク質は、融合タンパク質を示す、野生型ROSタンパク質よりもかなり小さい分子量を有する。

【0232】

ウエスタン・プロットにより、ROS融合タンパク質がチロシン・リン酸化されることを確認した。HCC78細胞由来のタンパク質溶解物を、ホスホ・チロシン抗体によって免疫沈降させ、総ROS抗体を用いてイムノプロットした。ROS抗体により、総溶解物と同じバンドがpY-IPから検出され、IP化されたバンドは、これもまたタンパク質のリン酸化を示す、少し遅い移動を有した。

【0233】

20

〔実施例4〕

siRNAを使用した、異常なROSキナーゼを発現する哺乳動物NSCLC細胞株の成長阻害

ROSの切断型形態が、HCC78細胞株において細胞の増殖および生存を駆動していることを確認するために、siRNAサイレンシングがこれらの細胞の成長を阻害する能力を試験した。ROSの発現を、RNA干渉によって下方調節した。以下のROS siRNAは、Proligo, Inc. から注文したものであり、対応するROS配列を括弧内に示した：

5' AAGCCCGGAUGGCAACGUUTT3' (ROS1(6318~6340)) (配列番号：31)；

30

5' AAGCCUGAAGGCCUGAACUTT3' (ROS1(7181~7203)) (配列番号：32)。

【0234】

2×10⁵細胞を、トランスフェクションの前日に、12ウェル・プレート中に播種した。100nMのROS1 siRNAを、Mirus TransIT-TKO Transfection Reagentを使用してトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、細胞をさらに24時間、飢餓培地に切り替えた。細胞をトリプシン処理によって回収し、次いで計数し、細胞溶解物をWBにおいて使用して、ROSタンパク質レベルをチェックした。

【0235】

40

イムノプロット分析により、ROSの発現が、HCC78細胞中へのsiRNAのトランスフェクションの72時間後に、特異的かつ顕著に低減されたこと、およびコントロール細胞株H2066がROSタンパク質を発現しないことが明らかになった(図2、パネルBを参照のこと)。これは、予測されるように、p-Erk1/2およびp-Aktなどの下流の基質のリン酸化の減少を伴った(図2、パネルCを参照のこと)。さらに、予測されるように、ROS siRNAによる処置は、切断されたPARPの検出によって決定されるように、HCC78細胞株のアポトーシスの増加を生じた(しかし、コントロール細胞株H2066中では生じなかった)(図2、パネルBを参照のこと)。細胞の80%は、図2、パネルAに示されるように、ROS siRNAによるトランスフェクションの3日後に殺された。かかる結果は、HCC78細胞株中の変異体/切断型ROSキ

50

ナーゼが、これらのNSCLC細胞の増殖および成長を駆動していること、ならびにかかる成長および増殖が、ROSキナーゼ発現を阻害するためのsiRNAを使用することによって阻害され得ることを示している。

【0236】

〔実施例5〕

SLC34A2 - ROS融合遺伝子の単離および配列決定

NSCLC細胞株(HCC78)中で検出されたROSキナーゼの切断型形態の存在を考慮して、キメラROS転写物が存在するか否かを確認するために、ROSのキナーゼ・ドメインをコードする配列上のcDNA末端の5'の迅速増幅を実施した。

【0237】

相補的DNA末端の迅速増幅

RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して、HCC78細胞株からRNAを抽出した。DNAを、DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出した。cDNA末端の迅速増幅を、cDNA合成のためにプライマーROS - GSP1を用い、ネステッドPCR反応のためにプライマーROS - GSP2およびROS - GSP3を用いて、5' RACE系 (Invitrogen) を使用して実施した。

【0238】

PCRアッセイ

RT-PCRのために、第1鎖cDNAを、オリゴ(dT)₂₀ (Invitrogen、Carlsbad、CAから市販される、カタログ番号18080) と共にSuperScript (商標) III第1鎖合成系 (Invitrogen) を使用して、2.5 μgの総RNAから合成した。次いで、SLC34A2 - ROS融合遺伝子を、プライマー対SLCROS - F1およびSLCROS - R1、SLCROS - F2およびSLCROS - R2を使用して増幅した。

【0239】

構築物

SLC34A2 - ROS融合遺伝子のオープン・リーディング・フレームを、Platinum Taq DNAポリメラーゼ高忠実度 (Invitrogen) ならびにプライマー対SLC - FbおよびROS - Rb (Bgl I I制限部位を有する) を使用して、HCC78細胞のcDNAからPCRによって増幅した。このPCR産物をレトロウイルス・ベクターMSCV - Neo中にクローニングした。プライマーは以下のとおりであった：

ROS - GSP1 : ACCCTTCTCGGTTCTTTCGTTTCCA (配列番号9)

ROS - GSP2 : GCAGCTCAGCCA ACTCTTTGTCTT (配列番号10)

ROS - GSP3 : TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT (配列番号11)

SLCROS - F1 : TCCATCCCAGCACCTGCGGAG (配列番号18)

SLCROS - R1 : CTCAACTCTCTATTTCCCAACAACGC (配列番号20)

SLCROS - F2 : CATGGCTCCCTGGCCTGAATTG (配列番号19)

SLCROS - R2 : CAACGCTATTAATCAGACCCATCTCC (配列番号21)

SLC - Fb : GAAGATCTCTGACCATGGCTCCCTGGCCTGAA (配列番号33)

ROS - Rb : GAAGATCTACGCTATTAATCAGACCCATCTCC (配列番号34)

【0240】

PCR増幅産物を、2ラウンド後に検出した。次いで、5' RACEによるROSに対

10

20

30

40

50

して5'側の配列の分析により、このキナーゼが、SLC34A2のN末端に融合したことが同定された。得られた産物の配列分析により、ROSのc末端が、SLC34A2遺伝子のN末端に融合したことが明らかになった(図3Cおよび3Dを参照のこと)。SLC34A2-ROS融合遺伝子は、インフレームであり、SLC34A2の最初の126アミノ酸が、ROSの最後の598もしくは495アミノ酸に融合されており(図3Bを参照のこと、1750における矢印は、C末端の598アミノ酸についての分断を示し、1853における矢印は、C末端の495アミノ酸についての分断を示す)、それぞれ2つのバリエーション融合タンパク質(長い、短い)を生じた。遺伝子構造の分析により、SLC34A2の最初の126アミノ酸をROSの最後の467アミノ酸と共に含むことが予測される別のバリエーション、非常に短いバリエーションが予測された(図3Eを参照のこと)。SLC34A2は、染色体4p15上に位置しており、ROSは染色体6q22上に存在していた。従って、この融合遺伝子は、t(4;6)(p15;q22)によって創出されたものである。図3Aを参照のこと。

10

【0241】

予測されたSLC34A2-ROS(VS)(即ち、非常に短いバリエーション)のアミノ酸配列および核酸配列は、それぞれ配列番号:28および配列番号:29に提供される。

【0242】

SLC34A2融合物の配列は、図4A(長いバリエーション、アミノ酸配列は上、核酸配列は下)および図4B(短いバリエーション、アミノ酸は上、核酸は下)中に示される。ヒトSLC34A2タンパク質のアミノ酸配列および核酸配列は図5中に提供され、転座に關与する残基は下線である。

20

【0243】

同様に、ヒトROSタンパク質のアミノ酸配列および核酸配列は、それぞれ図6Aおよび6B中に示される。図6Aおよび6Bにおいて、長いバリエーションに關与する残基には下線が付され、下線付きの太字の残基は、(短い)バリエーション転座に關与する残基であり、下線付きの太字の赤色残基は、予測された(非常に短い)バリエーション転座に關与すると予測される残基である。

【0244】

短いバージョンおよび長いバージョンについて、SLC34A2およびROSの融合を、RNAに対する逆転写PCRによって確認した。

30

【0245】

〔実施例6〕

SLC34A2-ROS融合タンパク質は、トランスフェクトされた293細胞の成長および生存を駆動する。

SLC34A2-ROS融合タンパク質の発現が正常細胞を癌性表現型に形質転換し得ることを確認するために、ヒト胚腎臓細胞(293細胞)を、SLC34A2-ROS融合タンパク質の長いバリエーションをコードする上記cDNA構築物でトランスフェクトした。

【0246】

上記SLC34A2-ROS cDNA構築物(長いバリエーション融合タンパク質をコードする)を、MSCVウイルス・ベクター中に挿入し、Superfectトランスフェクション試薬(Qiaagen、Valencia、CAから市販される)を使用して、HEK293細胞中にトランスフェクトした。48時間後、トランスフェクトしたHEK293細胞を回収し、ウエスタン・ブロットによってチェックして、予測された分子量の組換えSLC34A2-ROS融合タンパク質(長いバリエーション)の発現を確認した(図7を参照のこと)。

40

【0247】

〔実施例7〕

SLC34A2-ROS融合タンパク質は、形質転換された哺乳動物細胞株の成長および生存を駆動する。

50

SLC34A2-ROS融合タンパク質の発現が正常細胞を癌性表現型に形質転換し得ることを確認するために、3T3細胞を、上記のcDNA構築物で形質転換し得る。細胞を、10%胎仔ウシ血清(FCS)(Invitrogen, Carlsbad, CA)を含むDMEM培地(Invitrogen)中で維持した。

【0248】

レトロウイルス上清の生成および形質導入を、以前に記載されたように実施した。Schwalleraら、Embo J. 17巻(18号):5321~33頁(1998年)を参照のこと。3T3細胞を、それぞれMSCV-NeoベクターまたはMSCV-Neo/SLC34A2-ROS(長い)ベクターもしくはMSCV-Neo/ROS(短い)ベクターのいずれかを含むレトロウイルス上清で形質導入し、G418(500ug/ml)で選択した。安定にトランスフェクトされた細胞を軟寒天アッセイにおいて使用して、SLC34A2-ROSが3T3細胞を形質転換することを確認した。

10

【0249】

かかる分析により、SLC34A2-ROS融合タンパク質の発現が、3T3細胞を形質転換し、その結果この細胞の成長が付着非依存的になるか否かを確認する。次いで、ウエスタン・プロット分析を実施して、ROS、SLC34A2、SHP-1および他の可能なROSの下流標的のリン酸化状態をチェックする。

【0250】

〔実施例8〕

CD74-ROS融合遺伝子の単離および配列決定

20

第2のバッチのいくつかのヒトNSCLC腫瘍(患者CD042由来の腫瘍を含む)もまた、実施例1および2に記載された方法を試用して、グローバル・ホスホペプチド・プロファイリングのIAP技術を使用してスクリーニングした。リン酸化ROSキナーゼが患者CD042において検出された。この患者中に存在するこのROSキナーゼが、SLC34A2タンパク質とROSキナーゼ・タンパク質との融合物であるか否かを決定するために、ROSのキナーゼ・ドメインをコードする配列上のcDNA末端の5'の迅速増幅を実施して、キメラROS転写物がこれらの患者中に存在するか否かを決定した。興味深いことに、以下に記載されるように、別のROS融合遺伝子、即ちCD74とROSとの融合物が、この方法を使用して見出された。

【0251】

30

実施例4に記載されるように、RNeasy Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA)を使用して、腫瘍組織からRNAを抽出した。cDNA合成のためにプライマーROS-GSP1を用い、ネステッドPCR反応のためにプライマーROS-GSP2およびROS-GSP3を用いて、5'RACE系(Invitrogen(Life Technologies, Inc.の一部)、Carlsbad, CAから市販される)を使用した。

【0252】

PCRアッセイ

RT-PCRについて、第1鎖cDNAを、オリゴ(dT)₂₀(Invitrogen、カタログ番号18080)と共にSuperScript(商標)III第1鎖合成系(Invitrogen)を使用して、2.5μgの総RNAから合成した。次いで、CD74-ROS融合遺伝子を、プライマー対CD74-F1およびROS-GSP3:
ROS-GSP1: ACCCTTCTCTCGGTTCTTTCGTTTCCA(配列番号9)
ROS-GSP2: GCAGCTCAGCCA ACTCTTTGTCTT(配列番号10)
ROS-GSP3: TGCCAGACAAAGGTCAGTGGGATT(配列番号11)

40

CD74-F1: GCAGAAATGCCACCAAGTATGGCAA(配列番号26)を使用して増幅した。得られた産物の配列分析により、ROSのc末端が、CD74遺伝子のN末端に融合したことが明らかになった(図8、パネルBおよびCを参照のこと)。

50

CD74-ROS融合遺伝子は、インフレームであり、CD74の最初の208アミノ酸がROSの最後の495アミノ酸に融合されており(図8、パネルBを参照のこと)、融合タンパク質を生じた。CD74は、染色体5q32上に位置しており、ROSは染色体6q22上に存在していた(図8、パネルAを参照のこと)。従って、この融合遺伝子は、t(5;6)(q32;q22)によって創出されたものである。

【0253】

CD74-ROSの配列は、図9中に提供される(上、アミノ酸配列;下、ヌクレオチド配列)。図9に示されるように、CD74由来の残基には下線が付され、ROSキナーゼ・ドメインの残基は太字書体で示されている。

【0254】

図10は、ヒトCD74の配列(アミノ酸は上、および核酸は下)を示しており、CD74-ROS融合物中に存在する残基には下線を付している。同様に、図11Aおよび11Bは、ヒトROSのアミノ酸配列および核酸配列を示しており、CD74-ROS融合物中に存在する残基には下線を付している。

【0255】

CD74およびROSの融合を、RNAに対する逆転写PCRによって確認した。図12は、示されたプライマーを用いたPCRから生じたRT-PCR産物を示すアガロース・ゲルである。

【0256】

〔実施例9〕

免疫組織化学(IHC)によるROSキナーゼ・タンパク質の検出

NSCLC中で発見されたROS融合タンパク質が免疫組織化学によって検出できるかを決定するために、ROS特異的ウサギ・モノクローナル抗体を使用した。これらの研究で使用したROS特異的抗体(即ち、ウサギ・モノクローナル抗体ROS1 D4D6)は以前に記載されており(PCT公開番号WO2010/093928を参照のこと)、ROSタンパク質のキナーゼ・ドメインに対してC末端側であるヒトROSキナーゼ・タンパク質上の領域に特異的に結合する。D4D6抗体は未だ市販されていないが、類似のROS特異的抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)のRos(C-20)抗体、カタログ番号sc-6347およびCell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA)のROS(69D6)抗体、カタログ番号3266を含むがこれらに限定されない種々の供給業者から市販されている。

【0257】

これらの研究のために、556人のNSCLC腫瘍のヒト・サンプルのコホートを、パラフィン・ブロックとして調製した。全ての腫瘍サンプルを、2人の独立した病理学者が評価したところ、246の腺癌、64の気管支肺胞癌腫、226の扁平上皮および20の大細胞癌腫の症例を含むことが見出された。

【0258】

免疫組織化学: 4~6µmの組織切片を、それぞれキシレンおよび段階的エタノールによって、脱パラフィン化および再水和した(例えば、それぞれ5分間のキシレンの3回の交換を介し、次いでそれぞれ5分間の100%エタノールの2回の交換および95%エタノールの2回の交換を介して再水和)。スライドをdiH₂O中でリンスし、次いで1.0mM EDTA、pH8.0および製造業者の設定: SP1は125で30秒間およびSP2は90で10秒間、を使用する、Decloaking Chamber (Biocare Medical, Concord, CA)における抗原回復に供した。スライドを、3% H₂O₂中で10分間クエンチし、次いでdiH₂O中で洗浄した。加湿チャンバ中でのTris緩衝化生理食塩水陽性0.5% Tween-20(TBST)/5%ヤギ血清中でのブロッキング後、スライドを、Signal Stain(登録商標) Antibody Diluent(#8112 Cell Signaling Technology, Danvers, MA)中に希釈した0.19µg/mlにおいて、R

10

20

30

40

50

OS1 (D4D6) XP (商標) Rabbit mAbと共に4で一晩インキュベートした。TBS Tで洗浄した後、加湿チャンバ中で室温で30分間のインキュベーションを用いて、Envision positive (Dako、Carpinteria、CA) またはSignal Stain (登録商標) Boost IHC Detection Reagent (HRP、Rabbit) (カタログ番号8114 Cell Signaling Technology、Danvers、MA) のいずれかで検出を実施した。Signal Stain (登録商標) Boost IHCスライドについて、スライドを洗浄した後(例えば、TBS T中で3回)、スライドを次に、製造業者の指示に従って調製したNovaRed (Vector Laboratories、Burlingame、CA) に曝露させた。

10

【0259】

スライドを1分間発色させ、次いでd i H₂O中でリンスした。スライドを、ヘマトキシリン(直ぐに使用できる、Invitrogen (Carlsbad、CA) から市販される、カタログ番号00-8011) 中で1分間インキュベートすることによって対比染色し、d i H₂O中で30秒間リンスし、ブルーイング試薬(Richard Allan Scientific、Kalamazoo、MI (Thermo Scientific社)、カタログ番号7301) 中で20秒間インキュベートし、次いで最後にd i H₂O中で30秒間洗浄した。スライドを、それぞれ20秒間の95%エタノールの2回の交換、およびそれぞれ2分間の100%エタノールの2回の交換によって、脱水した。スライドを、それぞれ20秒間のキシレンの2回の交換できれいにし、次いで風乾した。VectaMount (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を使用してカバーガラスを載せた。スライドを風乾し、次いで顕微鏡下で評価した。Olympus DP70カメラおよびDP Controllerソフトウェアを備えたOlympus CX41顕微鏡を使用して、画像(20x) を獲得した。

20

【0260】

ROS特異的Rmab ROS1 D4D6を用いた免疫組織化学によってスクリーニングした556のNSCLC腫瘍のうち、9のROS1陽性腫瘍が同定された。概要は以下のとおりであった:

【0261】

246の腺癌のうち、8つ(または3.3%)が、ROS1キナーゼについて陽性であった。

30

【0262】

20の大細胞癌腫のうち、1つ(または5.0%)が、ROS1キナーゼについて陽性であった。

【0263】

弱い細胞質から強い核周囲凝集体までの範囲の種々のROS IHC染色パターンが観察された(図13A~Fを参照のこと)。5/9(55%)の症例において、ROSは、細胞質中に拡散して局在していた(図13A)。強い細胞質染色が、1つの大細胞癌腫において観察された(図13C)。2つの症例は、互いに異なる独自の表現型を有し、一方は点状細胞膜染色の領域で細胞質に拡散し(図13D)、他方は全体的な他の小胞染色であった(図13F)。稀な症例において、マクロファージおよび気管支上皮細胞などの非新生物細胞がROS D4D6で染色されたことにも留意すべきである。ROS発現は、周囲の間質組織には存在しなかった。

40

【0264】

〔実施例10〕

FISHアッセイを使用した、ヒト癌サンプルにおけるROS融合物の検出

ヒトNSCLC腫瘍サンプル中のSLC34A2-ROS融合タンパク質および/またはCD74-ROSタンパク質(または別のROS融合タンパク質)のいずれかの存在を、以前に記載されたように、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)アッセイを使用して検出した。例えば、Vermaら、HUMAN CHROMOSOME

50

S: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Pergamon Press, New York, N. Y. (1988年)を参照のこと。200を越えるパラフィン包埋ヒトNSCLC腫瘍サンプルを試験した。

【0265】

ROSが関与する再編成を分析するために、2色ブレイク-アパート(break-apart)プローブを設計した。近位プローブ(BACクローンRP1-179P9)および2つの遠位プローブ(BACクローンRP11-323O17、RP1-94G16)(これらは全て、例えばInvitrogen Inc.、Carlsbad、CAから、カタログ番号RPCI1.CおよびRPCI11.Cとして市販されている)を得た。これらのプローブがROS遺伝子に結合する位置は、図14中に模式的に示されている。図19Aに示すように、近位プローブはSpectrum Orange dUTPで標識し、遠位プローブはSpectrum Green dUTPで標識した。プローブの標識化は、製造業者(Enzo Life Sciences、Farmingdale、NY)の指示に従ってNick Translation DNA Labeling Kitを用いて実施した。FISHを、標準的な方法に従って、4μm厚のFFPE組織切片に対して実施した。例えば、パラフィン包埋した組織切片を再水和し、0.01Mクエン酸塩緩衝液(pH6.0)中で11分間のマイクロ波抗原回復に供した。切片をプロテアーゼ(4mg/mlペプシン、2000~3000U/mg)で25分間37で消化し、脱水し、FISHプローブ・セットと37で18時間ハイブリダイズさせた。洗浄後、Vectashieldマウティング(mounting)培地(Vector Laboratories、Burlingame、CA)中の4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール(DAPI;mg/ml)を、核の対比染色のために適用した。

10

20

【0266】

ROSについてFISH陽性の症例を、腫瘍細胞における>15%のスプリット・シグナルとして規定した。Nikon C1 Confocal顕微鏡、60xの対物レンズおよびトリフィルター(dapi、TRITC、FITC)を、各症例についてスコアリングのために使用した。画像獲得のために、40xの対物レンズおよびMetamorphソフトウェアを備えたOlympus BX-51広視野蛍光顕微鏡を使用して、3色画像を生成した。

30

【0267】

従って、ROS再編成プローブは、野生型(WT)配列中のROS遺伝子の分断点の反対側に、2つの示差的に標識されたプローブを含む(図14Aを参照のこと)。ハイブリダイズすると、ネイティブROS領域は、オレンジ色/緑色の融合シグナルとして現われ、この遺伝子座における再編成(SLC34A2-ROS融合タンパク質中に存在する場合)は、オレンジ色および緑色の別個のシグナルを生じる。

【0268】

図14Bに示されるように、再編成されたROS遺伝子が、HCC78において見出され(図14B、左のパネル)、これは上記のように、SLC34A2-ROS融合物を生じる遺伝子再編成を含む。ヒト肺サンプルの1つ、即ち肺306において、SLC34A2-ROSまたはCD74-ROSであり得る、類似のROS遺伝子再編成が見出された。

40

【0269】

FISH分析により、研究したサンプル集団におけるこのROS変異の低い発生率が明らかになった。最初の123のスクリーニングした腫瘍のうち、123の腫瘍のうち2つまたは1.6%の腫瘍が、ROS融合変異を含んでいた。しかし、NSCLCの世界中で高い発生率(米国単独で毎年151,000を超える新たな症例)を考慮すると、顕著な数の、この変異体ROSを有する患者の存在が予測され、これらの患者は、ROS阻害性治療剤レジメンから利益を受け得る。

【0270】

50

〔実施例 11〕

FIG-ROS 陽性 NSCLC 腫瘍の発見

実施例 9 から、腫瘍サンプルのうち 1 つ、即ち腫瘍 749 が、小胞区画に局在化した ROS1 染色を示した（図 13F を参照のこと）。この染色パターンは、全ての他の ROS1 陽性腫瘍から識別され、異なる ROS1 融合パートナーの可能性を指した。

【0271】

この腫瘍 749 の FISH パターンが何であるかを決定するために、第 3 の遠位プローブ RP11-213A17 を Invitrogen から得て、この腫瘍における ROS 変異が FIG-ROS 融合に起因し得るか否かをさらに調査した。FIG 遺伝子と ROS 遺伝子との融合物は、神経膠芽腫、胆管細胞癌および肝臓癌において記載されている（Charestら、Genes Chromosomes Cancer 37 巻：58～71 頁、2003 年；Charestら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100 巻：916～921 頁、2003 年；および PCT 公開番号 WO2010/093928 を参照のこと）が、この融合物は、肺では以前には記載されていなかった。FIG 遺伝子と ROS 遺伝子との融合は、転座も逆位も生じないが、第 6 染色体上の 240 キロベースの染色体内欠失から生じるので、新たなセットの FISH プローブを設計した。

【0272】

以前に記載された（上記実施例 11 を参照のこと）IHC 確認試験において使用される FISH プローブにより、SLC34A2-ROS 融合タンパク質または CD74-ROS 融合タンパク質のうち 1 つの存在に起因し得る ROS 平衡転座を有する腫瘍および細胞が同定された。肺 749 における FISH パターンは、再編成がこれら 2 つの融合物の 1 つではないが、潜在的には FIG-ROS のものであることを示唆した。肺 ID749 が実際に FIG-ROS 陽性であるか否かを決定するために、別の FISH プローブ・セットを設計した（図 15）。実施例 11 において上記したように、179P9 および 323017 BAC を含むプローブ・セット 1 は、本明細書中に記載される ROS 融合タンパク質中の ROS 分断点のいずれかの側に隣接していた（例えば、ROS のエキソン 34、35 または 36 の後）（図 15 および 14A を参照のこと）。SLC34A-ROS 陽性 HCC78 細胞（図 14B、左のパネルおよび図 16A を参照のこと）において、プローブ・セット 1 は平衡転座を生じる。FIG-ROS 陽性ヒト U118MG 神経膠芽腫細胞株において、323017 BAC はハイブリダイズしなかったが、これは、第 6 染色体のこの区域が欠失し、オレンジ色のシグナルだけを生じたからである（図 16C）。プローブ・セット 2 は、ROS 上に位置する 179P9 および FIG 遺伝子上に位置する 213A7 を含んだ、従って、このプローブ・セットでは、U118MG は、オレンジ色および緑色の両方のシグナルを示す（図 16D を参照のこと）。HCC78 細胞は、平衡転座を有する 1 つの染色体を示し（例えば、SLC34A2-ROS 融合物由来；図 16B 中の 2 つの黄色の矢印を参照のこと）、図 16B 中の白色の矢印は、緑色およびオレンジ色のシグナルが一緒に近接した正常染色体を指すが、これは、FIG 遺伝子および ROS 遺伝子が実際に、同じ染色体上で一緒に近接しているからである（図 16B を参照のこと）。野生型染色体は、プローブ間の距離に起因して、分離したシグナルを示した。肺 ID749 は、プローブ・セット 1（図 16E）またはプローブ・セット 2（図 16F を参照のこと）のいずれかで精査した場合、U118MG 細胞に似ていた（図 16C および D）。これらのデータは、NSCLC において第 6 染色体上の染色体内欠失として FIG-ROS 融合物を示した最初であった。

【0273】

〔実施例 12〕

肺腫瘍 749 由来の FIG-ROS(S) 融合遺伝子の単離および配列決定

腫瘍 749（これは、ホルマリン固定したパラフィン包埋腫瘍であった）由来の ROS 融合物を単離および配列決定するために、以下のプロトコルを使用した。

【0274】

FFPE 腫瘍サンプルからの RT-PCR：3 × 10 μm の切片由来の RNA を、標準

10

20

30

40

50

的なプロトコル (RNeasy FFPE Kit、Qiagen) に従って抽出した。第1鎖cDNAを、SuperScript III第1鎖合成系 (Invitrogen) を遺伝子特異的プライマーと共に使用して、500ngの総RNAから合成した。次いで、FIG-ROS融合cDNAを、短いアイソフォームについてPCRプライマー対FIG-F3およびROS-GSP3.1を使用し、長いアイソフォームについてPCRプライマー対FIG-F7およびROS-GSP3.2を使用し、増幅した。GAPDHプライマーは、Qiagen (Valencia, CA) から購入した。

プライマー

ROS-GSP3.1 : CAGCAAGAGACGCAGAGTCAGTTT (配列番号52)

10

ROS-GSP3.2 : GCAGCTCAGCCAACCTCTTTGTCCTT (配列番号10)

FIG-F3 : GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGG (配列番号53)

FIG-F7 : GTAACCCCTGGTGCTAGTTGCAAAG (配列番号54)

FIGのためのプライマーは、腫瘍749において観察されたFISHパターンおよびFIG-ROS融合物に関する公開された情報に基づいて選択したので、腫瘍749は、FIG-ROS融合物であることが予測された。

【0275】

予測されるように、腫瘍749におけるROS融合タンパク質は実際に、FIG-ROS融合物、具体的には、以前に記載されたFIG-ROS(S)融合物であった (PCT公開番号WO2010/0923828を参照のこと)。図17は、腫瘍749由来のFFPEブロック由来の配列 (「sbjct」のライン) の、PCT公開番号WO2010/0923828に記載されたFIG-ROS(S)由来の配列 (「query」のライン) のアラインメントを示す。図17に示すように、同一性はギャップ0で100%であった。FIG-ROS(S)は、ROSキナーゼのキナーゼ・ドメイン全体を含むので、このFIG-ROS(S)は、キナーゼ活性を保持すると予測され、従って、本明細書に記載されるROSキナーゼ活性を有するタンパク質である。

20

【0276】

FIG-ROS(S)のアミノ酸配列は配列番号: 58中に示され、FIG-ROS(S)のヌクレオチド配列は配列番号: 57中に示される。

30

【0277】

肝臓癌におけるFIG-ROS(L)もまた、記載されている (PCT公開番号WO2010/0923828を参照のこと)。FIG-ROS(L)のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号56および配列番号55に示される。さらに、FIG遺伝子およびROS遺伝子の遺伝子構造の分析に基づいて、第3のFIG-ROSバリエーション (即ち、FIG-ROS(XL)) が提案されている (PCT公開番号WO2010/0923828を参照のこと)。FIG-ROS(XL)のアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、それぞれ配列番号60および配列番号59に示される。NSCLCにおけるFIG-ROS(S)のこの知見を考慮すると、FIG-ROS融合タンパク質の他のバリエーションもまた、NSCLCにおいて見出され得る。

40

【0278】

〔実施例13〕

PCRアッセイを使用した、ヒト肺癌サンプルにおけるROSキナーゼ発現の検出

ヒト肺癌サンプル中の異常に発現された全長ROSタンパク質またはROS融合タンパク質 (例えば、SLC34A2-ROS融合タンパク質のうち1つ、CD74-ROS融合タンパク質、またはFIG-ROS融合タンパク質のうち1つ) の存在は、以前に記載されたゲノム・ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) または逆転写 (RT) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) のいずれかを使用して検出され得る。例えば、Coolisら、N. Engl. J. Med. 348巻: 1201~1214頁 (2003年) を参照のこと。

50

【0279】

簡潔に例として述べると、腫瘍または胸水貯留サンプルは、標準的な技術を使用してNSCLCを有する患者から得られ得る。切断型ROSキナーゼ、SLC34A2-ROS融合タンパク質、CD74-ROSまたはFIG-ROSに対するPCRプローブを構築した。RNeasy Mini Kit (Qiagen) が、腫瘍または胸水貯留サンプルからRNAを抽出するために使用され得る。DNAは、DNeasy Tissue Kit (Qiagen) を使用して抽出され得る。RT-PCRについて、第1鎖cDNAは、例えばSuperScript (商標) III第1鎖合成系 (Invitrogen) をオリゴ(dT)₂₀と共に使用して、例えば2.5mgの総RNAから合成した。次いで、ROS遺伝子またはROS融合遺伝子(例えば、SLC34A2-ROS、CD74-ROSまたはFIG-ROS)を、SLC34A2-F1およびROS-P3などのプライマー対を使用して増幅した(上記実施例5を参照のこと)。ゲノムPCRについて、融合遺伝子の増幅は、SLC34A2-F1およびROS-R1、またはSLC34A2-F1およびROS-R2などのプライマー対と共に、Platinum Taq DNAポリメラーゼ高忠実度 (Invitrogen) を使用して実施され得る。

10

【0280】

かかる分析は、切断型ROSキナーゼ(および/またはROS融合タンパク質、例えばFIG-ROS、SLC34A2-ROSもしくはCD74-ROS)の発現を特徴とする癌を有する患者を同定し、この患者は、ROS阻害性治療剤を使用する処置の候補である。

20

【0281】

〔実施例14〕

TAE-684およびクリゾチニブに対するROSキナーゼ融合物の感度

低分子TAE-684、5-クロロ-2,4-ジアミノフェニルピリミジンは、ALKキナーゼを阻害する。TAE-684の構造は、参照により組み入れられるGalkinら、Proc. National Acad. Sci. 104巻(1号)270~275頁、2007年中に提供されている。別の小分子、即ちクリゾチニブもまた、ALKキナーゼ、ならびにMETキナーゼを阻害する。クリゾチニブ(PF-02341066とも呼ばれる)の構造は、参照により組み入れられるZou HYら、Cancer Research 67巻:4408~4417頁、2007年および米国特許公開番号20080300273中に提供されている。

30

【0282】

TAE-684および/またはクリゾチニブもまたROS融合ポリペプチドを阻害するか否かを決定した。

【0283】

BaF3およびKarpas 299細胞は、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany) から得た。生存のためにインターロイキン-3を必要とするBaF3細胞を、10%胎仔ウシ血清(FBS) (Sigma) および1.0ng/mlマウスIL-3 (R&D Systems) を含むRPMI-1640培地 (Invitrogen) 中で37℃で維持した。Karpas 299細胞(リンパ腫細胞株) を、10%FBSを含むRPMI-1640中で成長させた。

40

【0284】

BaF3細胞を、FIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)またはFLT-3ITD(FLT3における内部タンデム重複変異はAML白血病を引き起こす)をコードするレトロウイルスで形質導入し、IL3非依存的成長について選択した。NPM-ALKを発現するKarpas 299細胞を、陽性コントロールとして使用した。レトロウイルスは、以前に記載されたように生成した(参照により組み入れられるPCT公開番号WO2010/093928を参照のこと)。

【0285】

50

MTSアッセイを、CellTiter 96 Aqueous One Solution Reagent (Promega、カタログ番号G3582)を使用して実施した。簡潔に述べると、24ウェル・プレート中 1×10^5 細胞/ウェルを、0 nM、3 nM、10 nM、30 nM、100 nM、300 nMまたは1000 nMのTAE-684を含む培地1 mL中で成長させた。72時間後、20 μ lのCellTiter 96 Aqueous One Solution Reagentを、96ウェル・アッセイ・プレート(平底)の各ウェルに添加し、次いで100 μ lの細胞を、処理ありまたはなしで成長させた。培地のみのウェルをコントロールとして使用した。96ウェル・プレートを、37 で1~4時間インキュベートし、次いで生存細胞を、96ウェル・プレート・リーダーを使用して490 nmで吸光度を読み取ることによって計数した。

10

【0286】

図18に示すように、FIG-ROSポリペプチドのうち1つを発現するレトロウイルスで形質導入されたBaF3細胞は、TAE-684の存在下で成長を停止した。FIG-ROS(S)は、FIG-ROS(L)よりもTAE-684に対して感受性が低かった。Karpas 299細胞もまたTAE-684の存在下で応答した(即ち、成長を停止した)。FLT3/ITDで形質導入されたBaF3細胞は、TAE-684に対して感受性ではなかった。2回の実験からのIC50値は、表4中に以下のとおりであり、データは、2回目の実験でのみ入手可能な最終細胞株、即ちmycタグ化ネオマイシンを発現するBaF3細胞からであった。

【0287】

20

【表4】

表4

TAE-684	IC50	IC50
FIG-ROS (L)	1.78 nM	2.84 nM
FIG-ROS (S)	10.16 nM	15.01 nM
FLT3/ITD	419.35 nM	316.44 nM
Neo-Myc	NA	1641.84 nM
Karpas-299	4.85 nM	4.36 nM

30

【0288】

次に、BaF3細胞およびKarpas 299細胞の死の機構を、アポトーシスについてのマーカーとして切断されたカスパーゼ-3を使用するフロー・サイトメトリー・アッセイによって、切断されたカスパーゼ-3陽性細胞の百分率を測定することによって評価した。これらの結果は、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA)から公に入手可能なプロトコルを使用して得た。図19に示すように、TAE-684の存在は、FIG-ROS(S)またはFIG-ROS(L)を発現するBaF3細胞に、アポトーシスによる死をもたらした。TAE-684の存在下で成長を停止したKarpas 299細胞は、アポトーシスにより死ななかった - これらは細胞周期停止を受けただけであった。従って、TAE-684がFIG-ROS融合ポリペプチドを阻害する機構は、TAE-684がALKキナーゼを阻害する機構とは異なっている。

40

【0289】

FIG-ROS融合ポリペプチドに対するTAE-684の作用の機構をさらに同定するために、4つ全ての細胞株(即ち、Karpas 299細胞、ならびにFIG-ROS(S)、FIG-ROS(L)およびFLT-3ITDをコードするレトロウイルスで形質導入されたBaF3細胞)を、0、10、50、または100 nMのTAE-684による3時間の処理後に、ウエスタン・ブロッティング分析に供した。全ての抗体は、C

50

Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA) からであった。

【0290】

図20に示すように、FIG-ROS(S)を発現するBaF3細胞およびFIG-ROS(L)を発現するBaF3細胞におけるFIG-ROS(S)およびFIG-ROS(L)の両方のリン酸化は、TAE-684によって阻害された。さらに、STAT3、AKTおよびERK、ならびにShp2のリン酸化は、FIG-ROS(S)を発現するBaF3細胞およびFIG-ROS(L)を発現するBaF3細胞において阻害された。STAT3、AKTおよびERK、ならびにShp2のリン酸化は、FLT-3ITDレトロウイルスで形質導入されたBaF3細胞では影響を受けなかった。TAE-684は、Karpas 299細胞においてもALKおよびERKのリン酸化を阻害した。ROS、ALK、LTK、InsRおよびIGF1Rは、同じファミリーのチロシン・キナーゼに属するので、これらは、キナーゼ・ドメインにおいて類似の構造を共有し得る。ALK、LTK、InsRおよびIGF1Rに対して設計されたキナーゼ・インヒビターまたは抗体は、ROSキナーゼに対する治療効果を有し得る。

10

【0291】

次に、平行セットの実験を、別の陰性コントロール、即ちneo-mycタグで形質導入されたBaF3細胞を追加して、同じプロトコルを使用して同じ細胞に対して実施して、2つのALK治療剤、即ちTAE-684およびクリゾチニブを比較した。

【0292】

図21A(TAE-684)および図21B(クリゾチニブ)に示すように、FIG-ROS融合タンパク質含有BaF3細胞は、同じ濃度の各治療剤で、クリゾチニブよりもTAE-684に対してより敏感であった。陽性コントロール、即ちNPM-ALK融合タンパク質を発現するKarpas 299細胞でさえ、同じ濃度では、TAE-684と比較してクリゾチニブに対して敏感でなかったため、クリゾチニブは、類似の用量のTAE-684ほど有効ではない可能性がある。陰性コントロール(即ち、FLT3-ITDで形質導入されたBaF3またはneo-mycで形質導入されたBaF3)の両方が、FIG-ROSタンパク質を発現するBaF3細胞およびNPM-ALKタンパク質を発現するKarpas 299よりも、クリゾチニブおよびTAE-684に対してあまり敏感でなかった。

20

30

【0293】

次に、0、0.1、0.3または1.0 μMのクリゾチニブによる3時間の処理後のウエスタン・ブロッティング分析を、Cell Signaling Technology, Inc. から入手可能な抗体を使用して実施した。図22に示すように、FIG-ROS(S)を発現するBaF3細胞およびFIG-ROS(L)を発現するBaF3細胞におけるFIG-ROS(S)およびFIG-ROS(L)の両方のリン酸化は、クリゾチニブによって阻害された。さらに、STAT3およびERKのリン酸化は、FIG-ROS(S)を発現するBaF3細胞およびFIG-ROS(L)を発現するBaF3細胞において、クリゾチニブによって阻害された。STAT3およびERKのリン酸化は、クリゾチニブ処理後に、FLT-3ITDレトロウイルスで形質導入されたBaF3細胞では影響を受けなかった。クリゾチニブはまた、Karpas 299細胞においてALK、STAT3およびERKのリン酸化を阻害した。ROS、ALK、LTK、InsRおよびIGF1Rは、同じファミリーのチロシン・キナーゼに属するので、これらは、キナーゼ・ドメインにおいて類似の構造を共有し得る。ALK、LTK、InsRおよびIGF1Rに対して設計されたキナーゼ・インヒビターまたは抗体は、ROSキナーゼに対する治療効果を有し得る。

40

【0294】

〔実施例15〕

ALKおよび/またはROSを発現するNSCLCの調査

ROSキナーゼに加えて、ALK活性を有するタンパク質を含むNSCLCもまた、記

50

載されている（例えば、米国特許第7,700,339号；米国特許第7,605,131号；米国特許第7,728,120号を参照のこと）。実施例9に上記されるIHC法を使用して、ヒトNSCLC腫瘍の多数のFFPEサンプルを、抗ROS抗体または抗ALK抗体による特異的結合についてスクリーニングした。かかる抗体は、多数の供給源から市販されている。

【0295】

同じサンプルを、標準的な方法を使用して、ROS遺伝子またはALK遺伝子についてFISHでもスクリーニングした。例えば、ROS遺伝子についてのFISHプロトコルは、上の実施例に記載されている。ALKについてのFISHプロトコルは、参照により本明細書中に組み入れられる米国特許第7,700,339号に記載されている。同様に、別のFISHアッセイは、参照により本明細書中に組み入れられる米国公開番号20110110923に記載されている。スクリーニングの結果は、以下の表5（ROS陽性サンプル）および表6（ALK陽性サンプル）に示される。

【0296】

【表5】

表5 ROS1 陽性サンプルの病理組織学

患者番号	腫瘍ID	診断	組織学パターン (%)	ROS1 FISH
1	147	腺癌	BAC (40)、乳頭(30)、腺房(20)、固形(10)	+
2	306	腺癌	腺房(70)、乳頭(20)、および固形(10)	+
3	570	腺癌	腺房(90)、BAC (5)、微小乳頭(5)	+
4	400037	腺癌	腺房	+
5	668	腺癌	固形(80)、腺房(10)、BAC (10)	+
6	702	腺癌	乳頭(40)、腺房(30)、固形(30)	+
7	749	腺癌	固形(80)、腺房(20)	+, 緑色欠失
8	760	腺癌	印(Signet)細胞	+
9	575	大細胞		スコアリング不能

【0297】

10

20

30

【表6】

表 6: ALK 陽性症例の病理組織学

患者番号	腫瘍ID	診断	組織学パターン (%)	ALK FISH
1	187	腺癌	固形 限局性の印細胞環特徴	+
2	307	腺癌	BAC (30)、腺房(10)、乳頭(10)、 固形(50) 明細胞および粘液性の特徴	+
3	587	腺癌	腺房(85)、固形(10)、乳頭(5)	スコアリング 不能
4	618	腺癌	固形	+
5	645	腺癌	固形(70)、BAC (30)	+
6	652	腺癌	乳頭(60)、微小乳頭(40)	+
7	663	腺癌	乳頭(50) BAC (50)	+
8	664	腺癌	腺房	+
9	666	腺癌	固形(90)、乳頭(10)	+
10	670	腺癌	固形(60)、乳頭(40)	+
11	680	腺癌	印環細胞の特徴を有する固形 (70)および腺房(30)	+
12	759	腺癌	印環細胞を有する固形	+
13	580	腺癌(不確定)		+
14	70	腺癌	固形	+
15	383	腺癌	BAC (40)、乳頭(30)、腺房(30)	+
16	395	腺癌	固形	+
17	278	扁平上皮; 大 細胞癌腫(不 確定)		+
18	330	大細胞神経内 分泌癌腫		+
19	503	扁平上皮		+
20	615	扁平上皮		+
21	644	扁平上皮		+
22	691	扁平上皮		+

【0298】

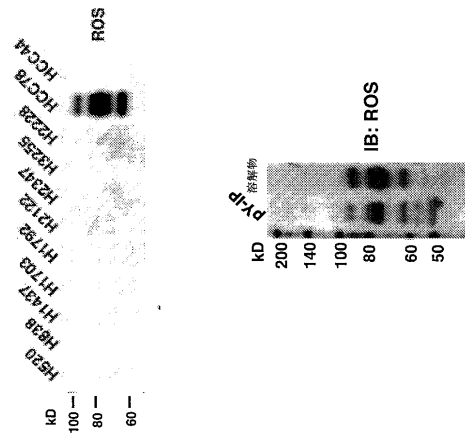
IHCおよびFISHの両方によるヒトNSCLCのこのスクリーニングに基づいて、これらの腫瘍におけるALKおよびROSの発現が相互に排他的であることが見出された。言い換えると、NSCLC腫瘍は、ALKによって駆動される場合、ROSを発現しない。同様に、NSCLC腫瘍は、ROSによって駆動される場合、ALKを発現しない。従って、ROS活性およびALK活性の両方を阻害するクリゾチニブまたはTAE-684などの治療剤は、NSCLCの処置において特に有効である。

【0299】

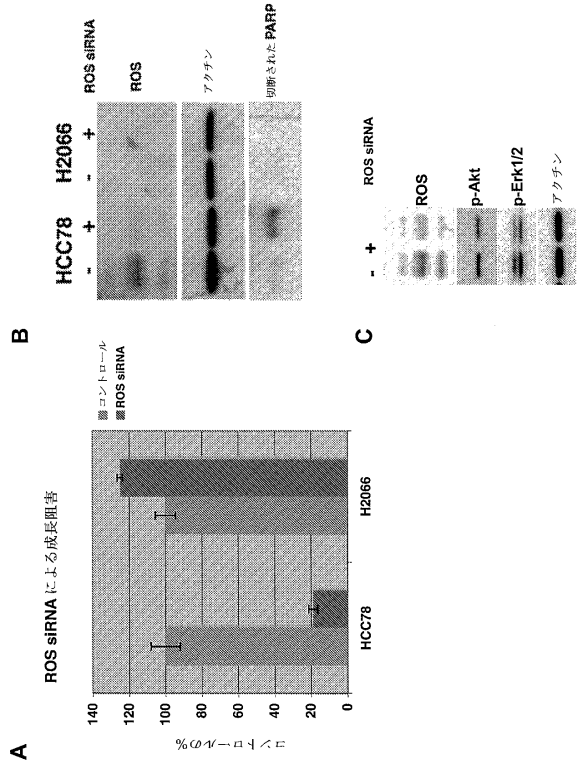
等価物

この開示はその詳細な説明と共に記載されているが、上述の記載は、例示を意図しており、添付の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定しないことを理解すべきである。他の態様、利点および改変は、以下の特許請求の範囲の範囲内である。

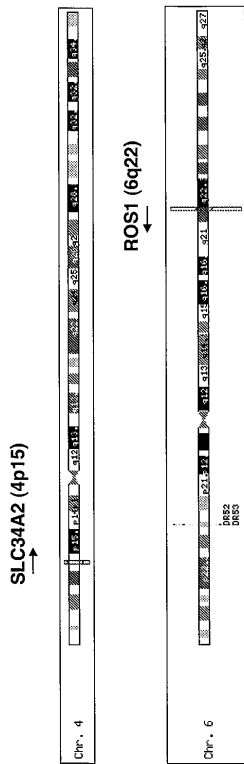
【 図 1 】



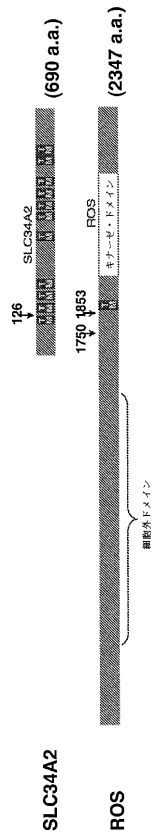
【 図 2 】



【 図 3 A 】



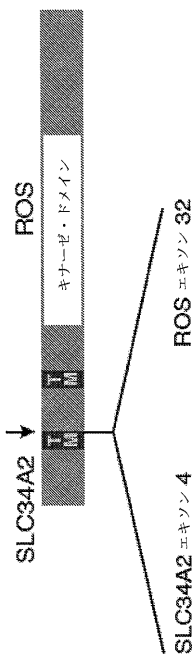
【 図 3 B 】



【 図 3 C 】

SLC34A2/ROS (長い)

(724 a.a.)

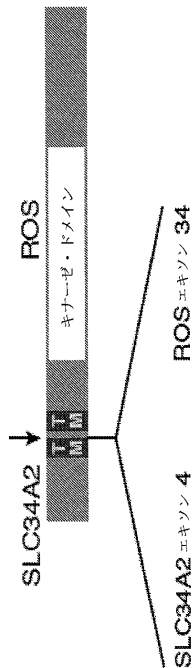


Atttcttagtaggcctccagctggttggagctggagctcccaataaaaccaggcattcccc
 I L S S A F Q L V G A G V P N K P G I P

【 図 3 D 】

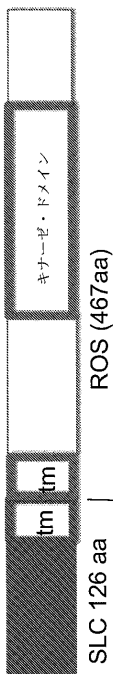
SLC34A2/ROS (短い)

(621 a.a.)



atttcttagtaggcctccagctggttggagctggagctcccaataaaaccaggcattcccc
 I L S S A F Q L V G D D F W I P E T S F

【 図 3 E 】



Atttcttagtaggcctccagctggttggagctggagctcccaataaaaccaggcattcccc
 I L S S A F Q L V G V W H R R L K N Q K

【 図 4 A 】

MAPWHELQDAQHPDKYLEGAAGQOPTAPDKSKETMKTONTTEAPVTKIELLPSYSTALIDEPTVEVDHPNLLPTDQSGI
 KMSERDTKNGILCFQIGRLILLGLFLYFVCSLDLSSAPFLVQAVPNKPGIDPLLESGKSIQWKAEDMCRITV
 YILEIRKSTSNLQNLNRWNTFNQSCSVCTWKSRLKGIQFQVVAANLGFQYSGISENILLVQDEWIPETSPI
 LTIIVGILVVIPLTFVWHRRLKQKSAKEGTVLINEDKLELKLGLAAGVLANACYAIHTLPTQSEIENLPAFPRE
 KLTLRLLLSGAQFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTQEKIEFLKHAHLSKFNHFNILKQLGVCLLNEQY
 ILEILMEGSDLLTYLRKARMAFYGPLLTLVDLVDLCVDISKQCVYLERMHFIERDLAARNCLVSVKDVTSPRIVKIGDF
 GLARDITENDYIKRGGESILVYRMAPESLMSIETFGDVMGKILLWELTIGHQPTFAHMLNVLNIVVQGRLEKLPF
 RNCDDDLNMLTQWAGQGRFTTHKQQQGLFRNFASIKSRDENNSVLINESEGEKDVICLSDSDIMFVAL
 METNREGLNMYLWLAETCCQGEERSEGPLSQSESESCGLRKEKEPHADKDFCQEKOVAXCPSCGPEGLNYACLTHSGYG
 DQSD

atggctccctggcctgaattggagatgccagcccaaccggcaatgacctcgaaagggccgaggtcagcagccac
 tgcctcctgataaaaagcaagagaccacaaacagataaacactgaggcaacctgtaaccaagatgaaactctggcgtcct
 actccacggctaacctgatagataggagccactgaggctggaaccctaccactctccaggactcggggatc
 aagtggtcagagagagaccccaagggagatctctctgtctcccaagggatggggatgaaacttaactctcggatct
 tctctactctttctgtgtccctggaactctctagtaggcctccagctggtggagctggagctcccaataaaaccag
 gcaatcccaaatctactagaagggaglaaaatccaatcagctgggagaagctgagaaatggatgtagaatcaatc
 tatactcttgagataagaagagcaactcaaatatctacagaccagaatlaaggtggagatgacatlaatggaac
 ctgcagtagtcttgacataggagctccaaacactgaaaggaatctcagctcagagtagtagtgcgaataatctag
 ggtttggtgaaatagtggaatcagtgagaaatctatctagtgagatgattttggataccagaacaaagttcata
 ctactactatagttggaatctctggttcttaacaaaccactgaccttctctgcatagaagataaagaatcaaaa
 aagtgccaaggaaggggtgacaglyctataaacagagacaaagagttgctgagctgagggctctgycagcggagtag
 gcttgctaaatgctgtagaatacactctccacccaagagagatgaaactctctgctccctcctggaa
 aaactgactctgctctctctgctgggaagtgagaccttggaagagtgatagaagaaacagcagtggaactcttaggact
 tggagtggaatcaaaagtagcagtgagacttgaaagggctccacagaccagagagatgaaactctcctgaag
 aggcactctgtagcaaatctaaatcaccacactcgaagcagctggagttgtctgctgaaagcaacccaatc
 attaactggaaactgaggaggaagagacctctactatctgctgaaagccggatggcaactcttatggctcctt
 actcaactctggtgacctgtagacctgtgtagatcttcaaaagcctgctctactctggaacggatgcaatctactc
 accaggtactggagctgaaactgctctgctgctgaaagactatacagctccaggaagtggaagatggagact
 gactgcccagacactataaaatgactactatagaagagagggagggctctccagctgggtgagctgctcc
 agaagttgtaggtagaactctactactcaactgtagtggctctttggaaactctgatttgggagatttaactc
 ttggtctcagccttaccagctcattccacacttga t g t g t t a a c t a t g t g c a a c a g a g g a c t g g a c c a c a
 agaattgtctgtatctgtggaatttaagaccagctgctggctcaagaaccagcaagcaactcttctcag
 aattcaggaccactcagttatcaagaaatcttcttaaatagcaatlaaagtcagagatgaagcaaacacagtg
 gagcaaaaagaaacttgaagtgaaatggagctgctgctgctgaaactcagatgacatctgctgcttata
 atgaaacagaaaccagagaggttaactatactgctgctcagagatgctgcaagtgaaagaaagctcaggg
 tctctaggctccaggaactgaaactgtgtgctgagaaagagaaagaaacacatgacagcaagattctgpc
 agaaaaaacagtgctctactgacctctggaacgctgaagcctgaaactgctctcactcacagtgtagatgga
 gatgggtctgattaa

【 図 6 B - 2 】

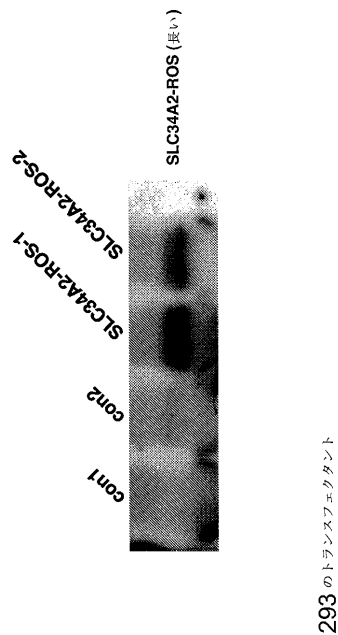
6B (続き)

```

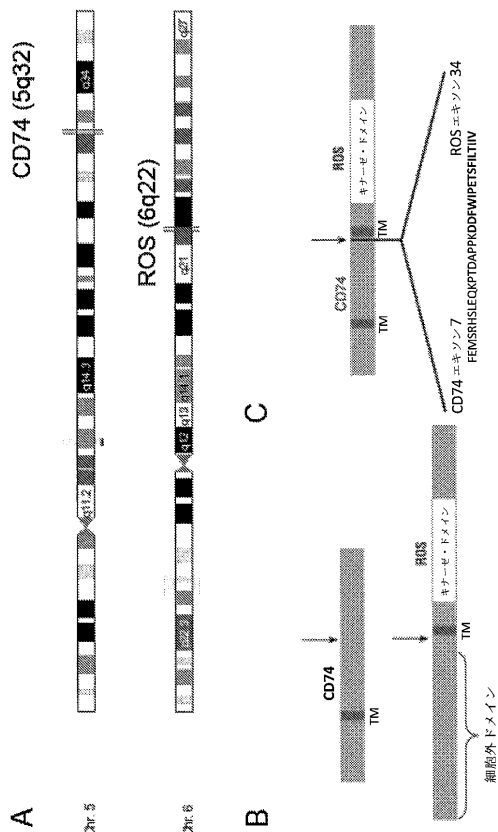
3781 gatgggat tatgctga gggactact ctttctctg cacttgaca atcgtctag
3841 cctgagcct ttccaagatt cactgctttt tgatataca gttattaca ttgactggat
3901 tccaagcac cctactttg cactgaaga atcacaat ggaatgcaag tatttgatgt
3961 tgactgtgaa cacaagtgaa aatccocag agaggtgaa atccacata ggaattccac
4021 aataattct tttctgtat atcctctttt aagtcctgt tattggacag aagtttccaa
4081 ttttgctac cagatgtct actacagtat taccagtoac accctgcaac gaattctgca
4141 acccaagct acaaacac aaacaaaag gaatcaagt tctgtaatg tgcctgaaat
4201 tggatgaat gggaaatgg cttatgtac cctcaacta gagaacacat tgatatactt
4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaagc tgcactggt ggagagttat
4321 cacagtact gctatgctg cagaaaaac cctgttgagc ttaactgtg atggagatct
4381 tatatactg atacacacag caaaggacag cacacagatt taccagcaa agaaagggaa
4441 tggggcaatc gtttcccaag tgaagccct aaggtatag catatcttg cttacagttc
4501 agttatgag ccttttccag ataaagott tctgtctcta gcttcagaca cgttggaacc
4561 aactatact atgccaata acactagcct cacactaga ttacctctg ccaagacaa
4621 cctcaatgg tatggcata ccagccctac tccaacata cctggtttat atgcagaagt
4681 taatgacag aaaaacagct ctgactgaa atatagaat cgtgatttc aggcagat
4741 agctcttatt gaagatttac aocattttc aacatacatg atacagatg cgtaaaaaa
4801 ttattatcca gatccttgg aacatttacc accagaaaaa gagatttgg gaaaaactaa
4861 aatggagta ccagaggac tgcagctcat taatacaact gtgggtcag accaccgct
4921 cattaatct tggagagat cttcaaaccc aatggacct aagagtagc tccgttatca
4981 gtggcaatc tcaactctg cctcaactct tgaactctc ctaagacaa gtgatttcc
5041 aatggaaag cttactctcc ttgtactag actgtctgt ggaatatt atgttttaa
5101 gtttctgccc tgcaactctg aggaatgtg gtgtacagag agtccctctg tcaactgtga
5161 aatgtttaa acaccagaga aaccttatt cttggtcca gagaacata gtttgaatt
5221 taatggaaag gctccattga atgttaacct catcagatt tgggttgagc tacagaagt
5281 gaatacaat ggttttacc atgttaaac tctatgagc caaggtctg cttatgtctg
5341 taatacaaa aactcaaac cttactctc atataatgtc agtgaatggt tggttataa
5401 gacgggaga aatgacact cacttccaga aagctttaa acaaaagctg ggttccaaa
5461 taaccagcc attccaaa tactagaag gactaaaaa tcaatcaggt gggagaagc
5521 tgaagataat ggtatgaaa tcaatacta tctcttga ataaagaa gacttccaa
5581 taattcaag acccaaat taagtgaaa gatgacatt aatgactct cagatgatt
5641 ttcacatgg aatccaaaa acctgaaa atatttccag tccaaatag tagctgaaa
5701 taatcaggt ttctgaaa atgtgaaat cagtgaat ablatatag ttggagatg
5761 ttttgata ccagaaaca ttctact tactatata ttggaaat ttctgtctg
5821 tacaatcca ctgactttg tctgctatg aagattaa aatcaaaa gttccaaag
5881 aggggtgaca ctgcttata acgaagaca agattgct gactgccc gctcggcagc
5941 cggagtggc ctgcttata cctgctatg aatcactct cttccaaacc aagagagat
6001 tgaattctt cctgcttcc ctgcaaaa actgactctg cctccttgc tgggaagtg
6061 agccttaca gaactatg aagcaaac actgactctg ttgactgct cagatgaga
6121 atcaaaaga cagtgaga ctgcttcc gacttccg actcccca gaccagaca agattgatt
6181 cctgagagc gcacatcga tgaacaaat taatcacc aacattctga agcacttgc
6241 agtttctctg ctgaatgac ccaatcact tctctgaa ctgactgag gaggacct
6301 tcttcttat ttgctttaa cccgattgc aacgtttat ggtctttac tcaacttgc
6361 tgaccttga gacttctg tagatattc aaragctgt gctacttgc aacgatgca
6421 tttcattac aggatctg cagcagaaa ttgcttct tctgcaaa actatccc
6481 tccacgata ctgaactg gacttctg actcccca gacttata aagattata
6541 ctatagaag aggggcaag gctctccc agtctccc atgctccc aagattgatt
6601 ggatgaaat ttcactact aatctgact atgtctttt ggaattctga tttggagat
6661 ttaactctt ggcactcag cttactcag tcaatcaca ctgactgt taaactatg
6721 gcaaacaga gggagctg agcccaag aatttctt gatgactgt gaaatttat
6781 gaccagctc tgggctcag amccgaca agactact tttctgaa ttcagacca
6841 acttctgta ttgcaact tttctttaa tactattt actctcag aagagca
6901 caactgga ctataaatc aagcttga agctgaat gctactga tttgttga
6961 ttcagatgc attatgca ttgctttaa ggaacgag acccgaga gtttaacta
7021 tatgactct gctacagat tggccaag tgaagaaa tctgaggtc cttaggctc
7081 ccaggactc gaacttct gctcagaa agaagaaa gaccacatc cagacaaa
7141 tttctgca gaaaacag tggcttact ccttctgc amcctgca gctgaacta
7201 tctctgca actcagag gatagaga tggcttct ttttctct gtttggaaa
7261 tggagctg agtataac tttctctg ttttctga aaaaac tcttgaag
7321 ataatgca tggctgctc taactcaca taacaatgc acgttcc

```

【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 - 1 】

```

MHRRRRSRSCREDQKPVMDQDRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGLALT
GFSILVTL LLAGQATTAYFLYQQQGR LDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPKPVV
KMRMATPL LMQALPMGALPQGMQNA TKYGNMTE DHVMHLLGNADPLKVYP
CLKGSPEN LRHLKNTMETIDWKVFESWMHHLWLFMSRHSLEQKPTDAPK
DDFWIPET SFILTIWIFLVVITPLTFVWHRR LKNQKSAKEGVTVLINEDKELAE
RGLAAGVGL ANACAYAIHTLPTQEEIENLPAFPRE KLTRLLLLGSGAFGEVYEGT
AVDILGVS GEIKVAVKTLKKGSDQEKIEFLKEA HLMKSFNHPKQLGVCV
LNPEQYIIE LMEGGDLLTYLRKARMTAFYPL LTLVDLVDLVDVDSIKGCVYLE
RMHFHHRDLAARNCLVSKDYTSPRIVKIGDF LARDIYKNDYRKRGEGLLPV
RWMAPRES LMDGIFTQSDVWSFGILWIEL TLGHQYPAPHSNLDVLYNYVTKSR
RLEPPRNC PDDLWNLMTQCWAQEPDRPTFHRIQDQLFRNFFLNSIYKSR
DEANNSGV INSEFGEEDGDVLCNSDDIMPVAL METKNREGLNYMVLATECGGQ
GEEKSEGL PLSQSESEGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYA
CLTHSGYGDGSD

```

```

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCAT
GGATGACCAGCGCCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGG
CCGGCCCTTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCCGGGAGCCCTGTAC
ACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGTGCCAGCCAGCCACC
CCCTACTTCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAACTGACAGCTCAC
CTCCGAAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCCATGAAGCTTCCCAAGCCCTCC
CAAGCCTGTGAGCAAGATGCCATGCCACCCCTGCTGATGCAGCCGC
TGCCCATGGGAGCCCTGCCAGGGGCCCATGCAGAAATGCCAAGTAT
GGCAACATGCAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCCAGAAATGCTGACCC
CTGAAGGTGTACCAGCACTGAAGGGGAGCTCCCGGAGAACCTGAGACA
CCTTAAGAACCCATGGAGACCATGACTGGAAGGCTTTGAGAGCTGGAT
GCACCATGGCTCCTGTTGAAATGAGCAGGCCTCCTGGAGCAAAAAGCC
CACTGACGCTCCACCGAAAGATGATTTTGGATACCAGAAACAAGTTTCATA
CTTACTATTATAGTTGGAATTTCTGTTTGTAACTCCCACTGACCTTTGT
CTGCATAGAAAGATTAAGAATCAAAAAGTGCCAAGGAAGGGGTGACAGT
GCTTATAACGAAGACAAAGATTTGGCTGAGCTGCCAGGTCTGCCAGCCG
GAGTAGGCCCTGGTAATGCCCTGCTATGCAATACATACTTCCAACCCAAGA
GGAGATTGAAATCTTCTGCTTCCCTGGGAAAACCTGACTCTGCTCT
CTTGTGGGAAATGGAGCTTTGGAGAAGTGTATGAAGGAACAGCAGTG
GACATCTTAGGAGTTGGAAGTGGAGAAATCAAGTAGCAGTGAAGACTTT
GAAGAAGGTTCCACAGACCAGGAGAAGATTGAATCTGAAGGAGGACT
CATCTGATGAGCAAATTAATCATCCCAACTTGAAGCAGCTGGAGTT
TGCTGCTGAATGAACCCCAATACATTATCTGGAAGTGAAGGAGGAGG
AGACCTTCTACTTATTTGCGTAAAGCCGGATGGCAACGTTTATGTTCC
TTTACTCACCTTGGTTGACCTGTAGACCTGTGTAGATATTTCAAAAG

```

【 図 9 - 2 】

(続き)

CTGTGTCTACTTGGAAAGCGGATGCATTTCAITTCACAGGATCTGGCAGCTAG
AAATGCGCTTGTTCCTGGAAGAGATACCGAGCCACGAGTGAAGAG
TGGAGACTTTGACTCGCCAGACATCTATAAAAAGATTACTATGAGAA
GAGAGGGGAAGGCGCTGCCAGTTCCGGTGGATGGCTCCAGAAAGTTG
ATGGATGGAATTTTACTACTCAATCTGATGATGGTCTTTTGAATTTCTGA
TTTGGGAGATTTAACTCTTTGGCTATCAGCCTTACCGAGTCTTCAACACT
TGATGTGTTAACTATGTCGCAAGAGAGGAGGACTGGAGCCACCAAGAA
ATTGTCTGATGATCTGTGGAATTAAGACCCAGCTGGCTGGCTCAGAAG
CCGACCAAGACCTACTTTTATAGAAATTCAGGACCACTTCAGTATTCA
GAAATTTTTCTTAAATAGCAATTTAAGTCCAGAGATGAAGCAAAACAAGCT
GGAGTCATAAATGAAAGCTTGAAGGTGAAAGTGGCGATGTGATTTGTTGA
ATTAGACTACATTTGCGAATTTGCTTAAATGAAACAAGGAAAGGAAAGG
CTTAACTATATGTTACTTGTCTGCAATTTGCGCAAGGTTGAAAGAAAGTCT
GAGGGTCTCTAGCTCCAGGAAATCTGAATCTTGTGGTCTGAGGAAAGAA
GAGAAGGAAACCACTGCAGCAAAAGTTTCTGCCAAGAAAGAACTGGCT
TACTGCCCTTCTGGCAAGCTTGAAGGCTGAACTTACTGCTTCTCACTCA
ATGCGATATGGAGATGGTCTGATTA

【 図 1 0 】

MHRRRSRSCREDOKPVMDORDLISNNEOLPMLGRRPGAPESKCSRGALY
TGSILVTLLLAGOAATAYFLYOQGRDLKLTVTSONLOLENLRMLPKP
PKPYSKMRMATAFLMOALPMGALPOGMONATKYGNMTEHDHVMHLLQAD
PLKVYPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKFVSEWMHHLFEMSRHSLEQ
KPTDAPPKVLTQCQEVESHIPAVHPGFRPKCDENGNYLPLQCYGSIGYC
WCVPNGTEVPTNRSRHHNCSELEDDPSSGLGVTKQDLGPAL

CAGGGTCCAGATGCACAGGAGGAAAGCAGGAGCTGTCCGGAAAGATCAG
AAGCCAGTCAATGGATGACCCGGGACCTTATCTCCAAACAATGACCAACT
GCCATGCTGGCGCGCCCTGAGCAAGTCCGCCAGGCAAGTGCAGCCGCG
GAGCCCTGTACACAGGCTTTTCCATCTCGTGGTACTGTCTCTCGCTGGCA
GAGCCACCCAGCCCTACTTCCGTACTCCAGCAGGAGGCGGCTGGCAACA
ACTGACAGTCACTCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGC
TTCCCAAGCCCTCCAAAGCCTGTGAGCAAGTCCGCATGGCCACCCCGCTG
CTGATGCAGGCGCTGCCATGGGAGCCCTGCCCAAGGGGCCATGCAGAA
TGCCACCAAGTATGCAACAATGCAGAGGAGCACTGTGATGCACTGCTCCG
AGAATGCTGACCCCTGAAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCG
GAGAACCTGAGACACTTAAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGT
CTTTGAGAGCTGGATGCACCATGGCTCTCTTTGAAATGAGCAGGCACT
CCTTGGAGCAAAAGCCACTGACGCTCCACGAAAGTACTGACCAAGTCC
CAGGAAGAGGTCAGCCACATCCCTGCTTCCACCCGGGTCTATTACAGGCC
CAAGTGCAGACGAGAAGCCAACTATCTGCCACTCAGATGCTATGGAGCA
TCGGCTACTGCTGTGTCTTCCCAACGGCAGGAGCTCCCAACACAC
AGAAGCCGGCCGACCACTAACTGCACTGATGATCACTGAACTGGAGGACC
GTCTTCTGGCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCAGCTCTTTG

【 図 1 1 B - 1 】

11B

1 caagcttca agcattcaaa ggtctaatg aaaaaggcta agtattttt caaaaggcaa
61 gtatactca atagacaata caaaaacaag caaatccatc cagctactcc tcaactttaa
121 gtagtagaac ccaataaact atagataga aatggagaaa attagacagc ccaactataaa
181 atgtgccatt ggtgaaga gaaagaacct ctactgtgct attagacagc ctgtcaattt
241 tgcacactct ggtgctcat gattctctgt ggtgcaagt acagtttta atagcttct
301 aaagtctgt gtaactaat tggcgcagca gcttgacctt ggcaccacac ataactgtag
361 tgaacctgt atccaaagt gctactttt gaactctgta gtcagaana actgtgctt
421 aaagtctgt ggtgctcat gattctctgt ggtgcaagt acagtttta atagcttct
481 agtactgtaa atgcaagac taccactgct tccctttgct tcttccattg gaagccataa
541 tatgaaacta cgtatgaaat ctgaaactt cctggaagta aaatacaata ctgtatgtaa
601 atgtgcaaan ctcttggaa gctgaacta tactagaact gbtccagaac ctctactgt
661 ggtcaaacct gtcacacct tcaactgata cttttccaga gttgtttgga tcttccagc
721 gtagtctgag ctactaacct ctcocaaact cagttacag actcaactc atgagttct
781 tgaactgca ctttgatata gaaatattga gactcaagt cccagacact tggagatgac
841 ctggtgacca cctcaactcc cagttggacc tattttggtt tataacttaa gctgtatcag
901 caaaatcaa aaatgattgt caggacaaca gagaaccagt ttccagtttt actccacttt
961 accaaactct actcaactgt tttactatgc accagtaaat aaagtgtgtg atggtccaga
1021 agcaactct agtatcaaaa ctactctctc agactctgca caagagaaac atgtgtctt
1081 ttatccaga aaaaactctc taagaagaag actctttaa ctttagtag atagagaca
1141 ttgctctgag ttggtgata tacaactaa atattcaga atattctgt atgtccaca
1201 gcaaatgtt tattctctgt aagaacctc catatggggc aagaaggctg ccaactgtc
1261 tgatgtatct gacttgaaga tttttacaag aggtcaagga ttaattctt ctactccat
1321 agattgctt tatcaaaa gttatttcat ctatgtagaa ctgtgtattg tctgtgatt
1381 agagaactt tcaaacatg agaatatc ctactctctc atgtgcaaaa ctcaactaa
1441 ttgctgtgat tcaacaagt gttatgtctt tccactctgt agagatgca tttatagac
1501 agactctct gtaacctct gcccgtgtg agaagtctg ctgtattgtg agagtgcac
1561 gttaaaagc tttaactaa agtcacaag caagcgaac attactga atgactga
1621 caagtctc gactcaaac tcttggatg ctctgtctc catctcatc taactcgaat
1681 ccccttgc gbtgtgaa gttgtatg tgaaaaact gaactttt tcaacatg
1741 caagttact tcaaacatg atgttctgt ttttaaatg tcaactgtg atgtgacct
1801 ggtcaacta gaagaattg gttttgtaa ctgtgtatc tttgtctat cctccaaagt
1861 gaacctct gcaagcgcgc ccagagact ctctgtgtg tttgtctc agccgctc
1921 tttcaactg agcctctgt ccccttccat agggccaat gtoactctg tcaagttag
1981 tattgaact tttaagtgt gcccctgtc ctggcagaac tggacctat agtgaagt
2041 atcccccga gacctctgt aagtcaacta tattttctg aacataagt gaacctgt
2101 gaatgacct gbtgtgaa gttgtatg atacaagtt tctgtgag caagtctc
2161 aagagaga gcccctgt caaagact agtggact accctgtgc cagctaga
2221 accccattt actctgtgt tgaagaaga tgggttgg agtaaacat taatgatt
2281 tggcccaga gcttctgct cctctgact aggaatgt tcaagactg atgtataa
2341 caaacgctc tactaacgt acagaaagc agactttt gttgtctgc tgaatggac
2401 ggaatctca gagaattac actcaaacg cttgcaaga gcaagggct tagtcttga
2461 gttgctggt caactttct actggtctg aaagactat gttatacaaa acagctctg
2521 ttgcccaga caacagaca gttttacca gttgaagta tttgttgg ccgtgtgt
2581 gttactgt gttgatac tcaactggac caactctat tcaagtgaa gccocagct
2641 aatgggaa agttccctgt tactacaga acagctgtg tttttgga aaaaagtat
2701 tgotactat tactaacca gttatggct cctgtattg ttgttcaaa acagctaat
2761 tattcaact tactaacgt ttctctggg acagacact gggatataca caatcaga
2821 attgcaagc tggagtact tgaatttt caagaatga ctgatgtact atactgtga
2881 gctgtctgt atcaactgt ttgatttat caactcaaa gaatagctc agaaaagct
2941 tttctctgt tggaaact ctaactgata tcaactgaa atacttca catctca
3001 gccctgcc aggaacttt cctctacc taagttat ccagttgt ttoagactc
3061 tctatttag atagaaga atgttcaag ttttcaact ctgtgaaat gtcocctgc
3121 gttgactgt gttgatttt tactaagt ttcaagtt agaatgtt atgtcttggc
3181 tagtgaaca caactctct ctgtattac bttggaaga ctgaaact atgtctt
3241 taactctct gtaactct tcaactatg gggaaagcc cccaaaact atgtctact
3301 tccagcct ctgcaagc atcaagacc agagaacca agaattta tactccag
3361 tggaaagc tgaacaa atagattgt gttgaattt aggtgaa caactaagca
3421 tgaaaaagc gtttaacaa aattgaaat tttcaact atatacaat aactattac
3481 aaaaaaaa tggagact gattgtgt caatgcct cccctagca tttctttca
3541 actgaagc atgtacca gacttttat tgccttcaag gttaggct ttaactca
3601 gggccaga csaatgct agttgttaa gttcaaca tgaagaatc accatttc

【 図 1 1 A 】

11A

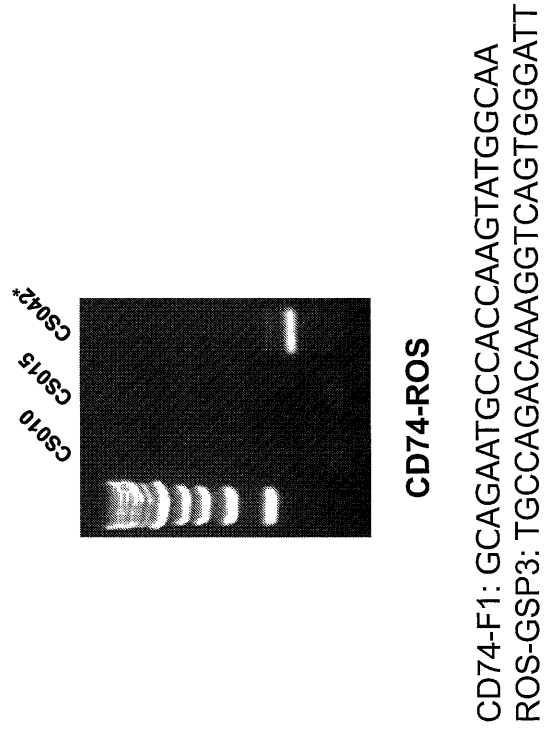
MKNYCLLPKLVNFATLGLMISVQCTVLNSCLKSCVTLNQDLDLPHLSEPCIQG
CFWNSVDQKNCALKRESECVGSSAEGAYEEVLENADLTPAPASSIGHMNLRLWS
SANFSGVKYIQLWYQALGLSYYTKTVSRPSYVVKPHFTTEYIFRVMVITQAQLYS
PPSPYRTHPHGVPETAFLRNIESSPDTVEVSDVDPQPGGILGNLRLISKQKLD
AGQRTSFFQVSTLNTPIYRFSIAVNEVGEPEASSITSSVAQQEQWLRKTSR
LRKRLKHLVDEAHLRLDAIYHNTGIVSDVHQIQVYFSEGTLIWAKAANMSVSDLR
IFYRSGCLISSIDWLQYRMVIMDELVCVDLNCNIEIITPPIISAPQIVQVMSF
GYVYLLRDLGIVYRDLVPSGRCAEAVRIVECTLDKFAIKPQAKRIIVFNPTQVMSF
FLDGSASHLLPFIIPADVKSPACENNDLFTVDGKVIYQQDALSFNEIYVGDLSHEEF
GFGNLVIFGSSQLHPLPGRQELSVLFGSHQALVQWKPALAIKANVILISDILIELEF
GFSANQWYIEVKSTQDPPEVTHIFLISCTMLNVPFLGSAHMYKVSVRASSPKRPPW
SEPSVTLTIPASEPPTIMVHEDGLWKPASISGPEFLSSDIGNVSDMWNANLISYS
PTKGDVFWLNLGTDISENHLPSIANGALAEFLWHLGFLWAGKTYVYQROSVLWHT
IVTHVLLNDMVDVSGVGLVWTLTYSVESTRINCESLVTQRPWPSKVKVIALTLDL
SDGLLWLVQDSQCILHTYAVLRQSTGDTTTEFAAASSTSEISQNALMYSGRLEWNG
FRITITTOIGQKTSVSVLEPARNFQITQISLKLPCNPSPTPKVIPDSVQSSFRIG
NASSFQILWNGPVAWDGWFVYSVEASHKPLASQHS.PVFTVGLIEPALNLSVTP
YTYKQKPKTSLSLRAPETVSPAPENPRIFILPSGKCNKNEVVFERFKNKHENGVL
KEFLYXNLSQSTINTKCEDWIAVNVTPSVMSFLEGMSPRCFIAQVRAFSTKSGPGEYA
DVVKTSEINFPFHLLTLGNKIVLDMQNVWVTSRAERVISAVCYTADNEMGYAE
GDSLFLHLHNRSSSELEQDSLVFDITVITDWSIRHLYFALKESQNGMVVDLEHV
KYPREVKHNRNRTIISFVYLLSRLYWEVSNFYQMYYSIISHLRLHQPTATNQ
QNRKQCSNVTEFELSGAMAIDTSLNLEKPLIYFAKAQEIWALDEGCQWVITVPAVL
AGKTLVSLTVDGDLIYITAKDSTQIYAKKNGAVISQVAKLRSHRILYASVMQPPF
DKAFLSLADTVEPTILNATNTSLTRILPLAKTNLTWGTSTPTTPIVYVAENDRKNS
SDLKYLEFQDSIALIEDLPFTYMIQIVARNYSDPLEHLPFKIEWKTNGKVPFA
VQLINTVRSDFSLIISMRSHKPNKPEKSVRYQLAISHALIEPFPBQSPFNGR.TL
LVFRLSGNLYLVKVLACHSEWPEFESHVPEVEMNPEKYSIYFENISLQWKAJL
NNLIRFWELQKWFNEFVHTVCSOGFAYCNITWLOPVTSYNWRVVWYTKTGAST
SLPESKTKAGVWPKGIPKLEGSKNSIQEKAEENCRITYSILEIRKSS'NNLQNK
LHWKMTNGSCSSVCTWKSNIKQIFQ'RVVANAANLGEVSGVLENLVDGFTGIPET
SEIITIVIGLIVVITPIPTVWHRR.KNKQSAKGVTVLINDKLELABLRLAAGVGLAN
ACYAHTLPTOEIENLPAFPREKTLRLLLSGAGFGEVYECTAVIDLGVSGEIKVAVK
TLKKGSTDEKIEFLKHAHMSKFNHNLKQGLVCLNPEQYIILEMGDDLLYLRK
ARMATFYGLLTLVLDVLDICSKGVYLERMHIRDLAARNLCLVMDTTPRIVKI
GDFGLARDIYKNDYKRGGLLPLVRMWAPESLMDGIFTTQSDVNSFGLIWE.LFLGHQ
PYPAHNSLDLVLYVQTTGRLPEPRNCDDLNWMLTQCWAQEPDRPTFHRIQNOLOFRN
FFLNSIYQCRDEANNISGVINESFEGEDGVICLNSDIMPVLMETKRNGLNMYLATE
CGQEEKSEGLPSQSESCGRKEKEKPHADKQFCQKQVAYCPSGPKRELVYACLTHS
GYDGS

【 図 1 1 B - 2 】

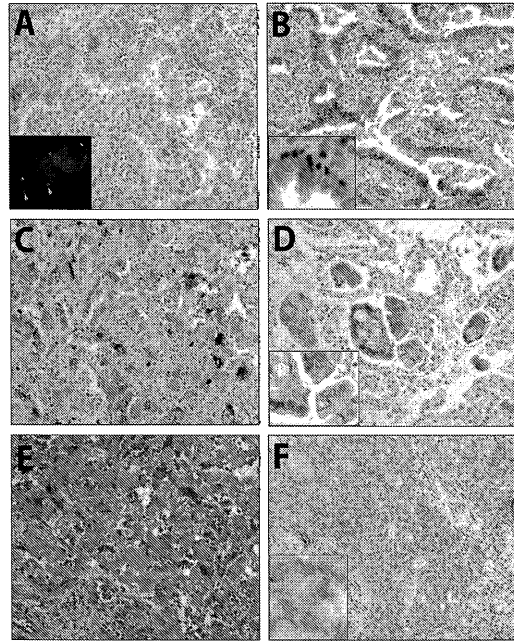
11B (続き)

3661 tcaoctcaata acotctottt gtaacaagat agtttcttta gatatggat aaaaaoagt
3721 tttgtggagc ttttcaagc aaagaattat cag55000tt tgcatacac ctgataaga
3781 gatgggat tatgtgaag gggactact ctctctctct caactgaca atcctgtact
3841 cctgagct tccaagat cactggttt tgcataca gttactaca tgcagctgat
3901 tccaagcact ctctactgt cactgaaga atccaacat ggaatcaac tattgtact
3961 tggatttga cacaagttga atataccag agagttgag attcaaca ggaatcaac
4021 aataatttt tttctgtat acctctttt aaqctctgt tgcataca ggaatcaac
4081 tttggtcact cagatgtct atcaactat tactcagtc acctgcaac gaattctga
4141 acccaactc acaaacca aaaaactaa gaaactaact tgcataca ggaatcaac
4201 tggatgaag ggaagaag ctattgatac ctccaacta gagaacact tgaataact
4261 tggcaaga caagaact gggcaatga tctggaaga tgcataca ggaatcaac
4321 cactgact gatactgt caggaaaa cctgttga tcaactgt atgagct
4381 tataactgt atataccag caaagacac cacacagat tacaogca agaaagaa
4441 tggggcact gtttccag tgaagcctc aaggaatg catatctgt ctacactgt
4501 agttatgag cttttcag ataaagctt ctctctctc gttcaaca ctgtgaaac
4561 aactaactc aatgcaacta caactaact caactaact tcaactgca ctcaacaa
4621 cctcaactg tatgataca ccaagcact tccaactac ctgtttatt atgcaagat
4681 tggcaaga caagaact gggcaatga atagaaga ctgcaactc atgcaactc
4741 agctctat caaactac caactttt caactttt caactttt caactttt caactttt
4801 tttattaca gatcttgg acatttca acacaagaa gaggttgtg aaaaactaa
4861 aatggatga ccaagagc tgcactact taactaact ggtgctgc acaactgt
4921 catatact tggagagt ctcaacgc aaatgcaat aaagaactc tccgttata
4981 gttggcaat tcaactct ccaactct tgaactct tgaactct tgaactct
5041 aatggagc ctaactct tgttactg actgtctgt ggaataatt atgtttaa
5101 tggcaaga caagaact gggcaatga atagaaga ctgcaactc tcaactgt
5161 aatgttca acacagca acctttat ctgttctc gagaacta ctgtgact
5221 taattgag gttcactg atgttaact ctaactgt tggttgag tcaactgt
5281 gaatacaat gattttac atgttaaac ttaactgaa caagctgt ctatgtct
5341 taactaca aatcaaac ctatactc atataact agagtgtg tggttata
5401 gaogggaga aatgcaact caactcaac aagcttga atactgtg atgtcaaca
5461 taaccagc atcccaat tactgaag gatttaaat tcaactgt gggagaagc
5521 tgaagata ggtatgaa ttaactca tctctgt atagaaga gcaactaa
5581 taattaca acagaagt taagttgaa gattcaact atagactc gaagtgt
5641 tgaactgt aagtcaca acctgaag atattcag ttaagtag tagtcaaa
5701 taactagc tttgtgat atagtagt cagttgag atattatg ttgagatga
5761 ttttggata caagaaca gtttact tacttata tttgattt tttgtgtg
5821 tcaactca ctgacttt tctgacta tacttata taacttaa atactaa atactaa
5881 agggcaga gttctata acgaagca agattgct gactgcaac gttgcaagc
5941 gttgtagc ctgcaact cctctact atactact ctgcaact ctgcaact
6001 tgaactct ctgctctc ctgcaaaa ctgcaaaa ctgctctc gttgtagc
6061 agctttga gaattgt atgcaaga agttgact tggattgt gaattgag
6121 aatcaaga ccaactgaa ctgtgaaa ggtttcca ccaagaga agattgag
6181 ctggaagc gcaactga tgaactat taactcaac aactctga agactgt
6241 atttctct ctgactga ccaactat tacttata taacttaa ctgactga agactgt
6301 tcaactat tggatga accagtag aactttat gttctctc tcaactat
6361 gacttata gactgtgt tagatttta aagagctt ctgactgt accgatac
6421 ttcaactc aggtatgt cagctgaaa tttctttt tttctgaa actatacag
6481 tcaactga gtaagatt gactctgc actgcaag gactcaaa aatgatt
6541 ctatagaag aggggaa gctgctcc tttctgtg atactca agatttga
6601 gttgaaat tcaactat aatctggt atgtcttt gaaactga tttgaaat
6661 tcaactct gtaactga cttaacag taactcaac ctgactgt taactatg
6721 gaaagag gggactgt acccaaa aatgtagc atactgt gatactgt
6781 accactgt tggctcag acccgaca aagactact tttcaaga tgaagaca
6841 actcaact tcaagaat tttcttaa tagcttat agctttt ctgactga atagaac
6901 caactgga gtaataat aagcttga agttgag gctgaga tttgttaa
6961 tcaactat attagcag tttcttat gaaagcag acccgaga gttactaa
7021 tagtact gtaactat gttgcaag tgaagaaa atactgact ctgactgt
7081 caactat gactct ctgactga atagaga atagaga gaactat caactga
7141 tttctca aaaaacag tttcttat caactgt acccgaga gttactaa
7201 tttctct actcaact gatagaga tttgttat taatgact tttgaga
7261 tagagatt agataaac tctactcag tagtacta gaaacaact ctgactgt
7321 aatattca tttgttca taactcaaa taactaagc actgtc

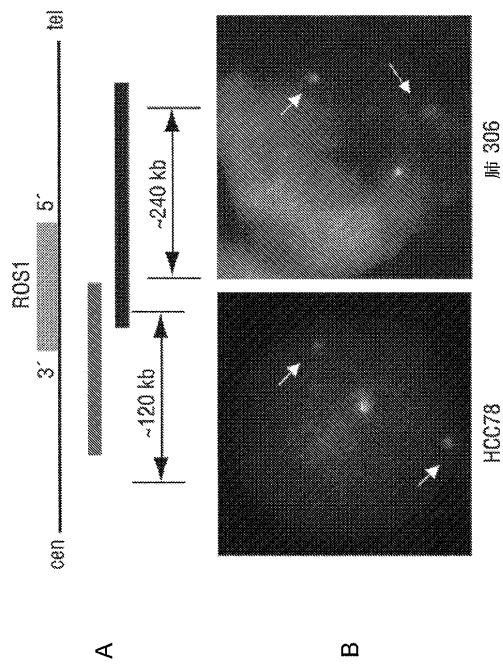
【 図 1 2 】



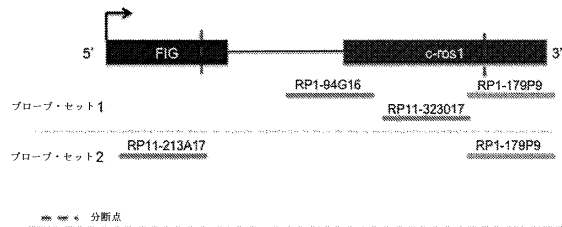
【 図 1 3 】



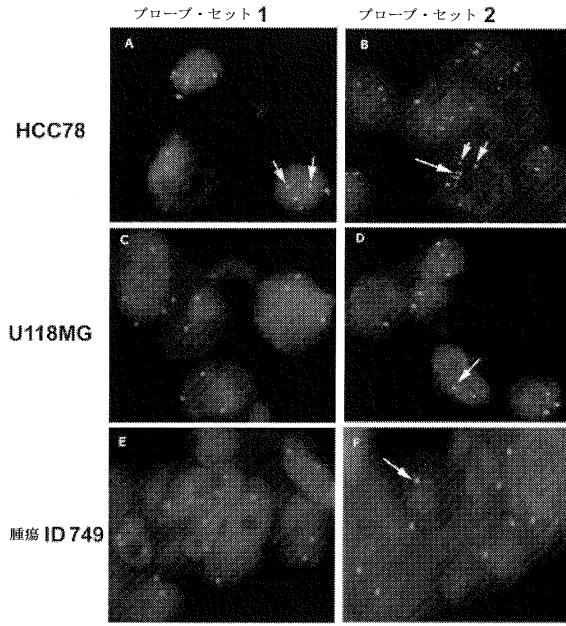
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

```

>lcl|9303
Length=167

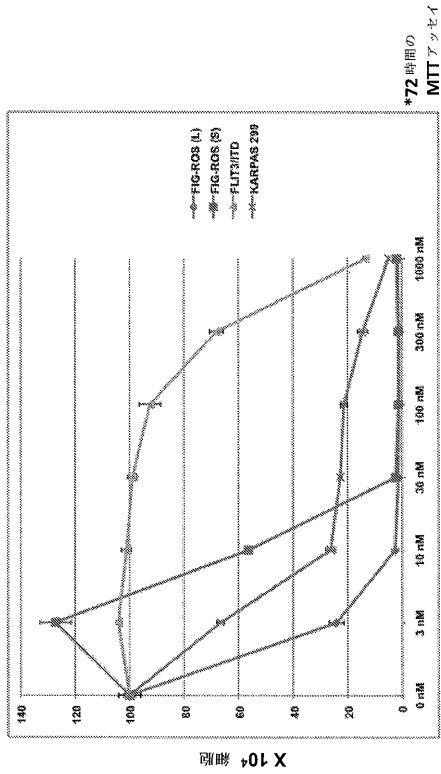
Score = 272 bits (147), Expect = 3e-77
Identities = 147/147 (100%), Gaps = 0/147 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 556  GCTGTCCTCCAGGCTGCACTATATGGGGCGACACTAGCTCCAGTACTTGGATACGGAA 615
             |||
Sbjct 3      GCTGTCCTCCAGGCTGCACTATATGGGGCGACACTAGCTCCAGTACTTGGATACGGAA 62

Query 616  CTGGCAGGAGTACTCTTCCAAACCCAGAGGAGATGAAAATCTTCCTGCTTCCCTCCG 675
             |||
Sbjct 63    CTGGCAGGAGTACTCTTCCAAACCCAGAGGAGATGAAAATCTTCCTGCTTCCCTCCG 122

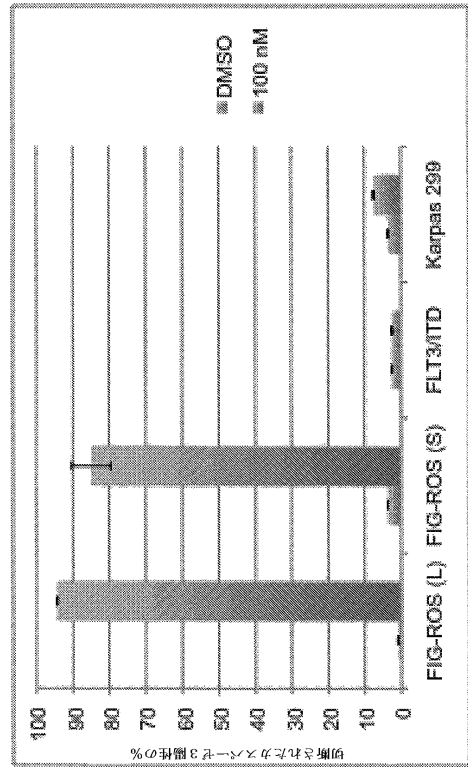
Query 676  GAAAACTGACTCTGGGTCCTTGGCTG 782
             |||
Sbjct 123  GAAAACTGACTCTGGGTCCTTGGCTG 149
  
```

【 図 1 8 】



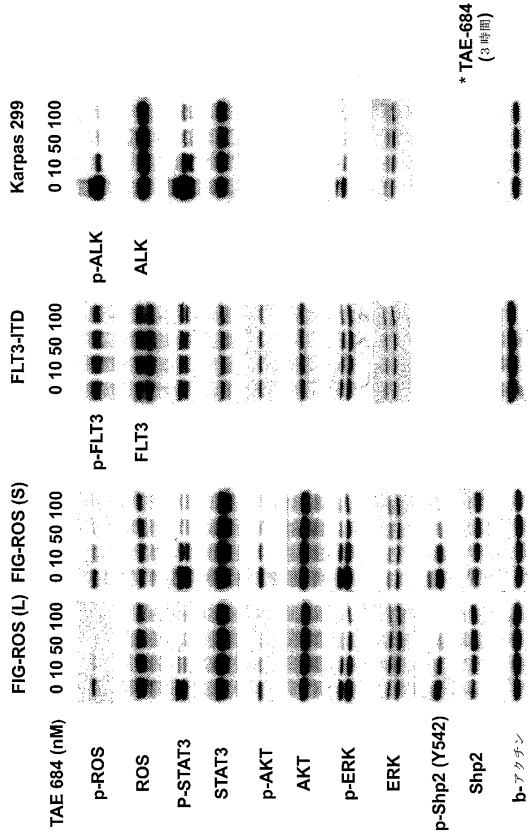
【 図 1 9 】

TAE-684 は、FIG-ROS 発現 BaF3 細胞において
アポトーシスを誘導する

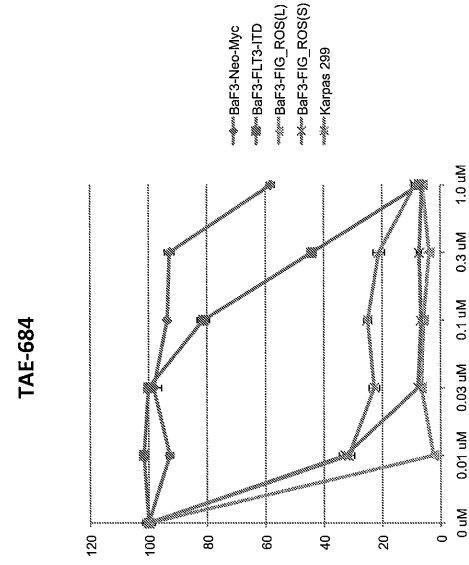


【 20 】

FIG-ROS のリン酸化は、TAE-684 によって阻害される

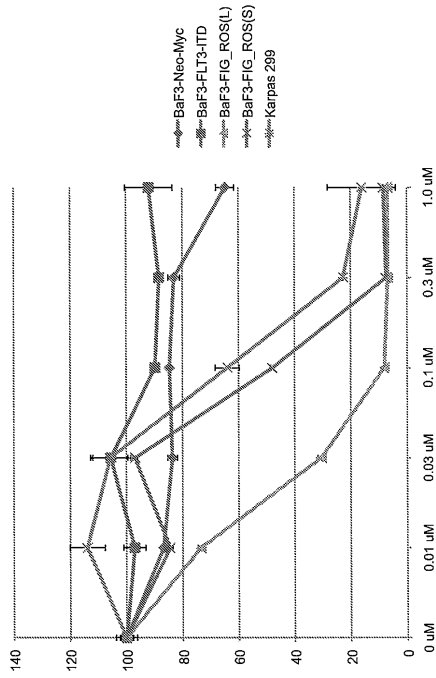


【 21 A 】

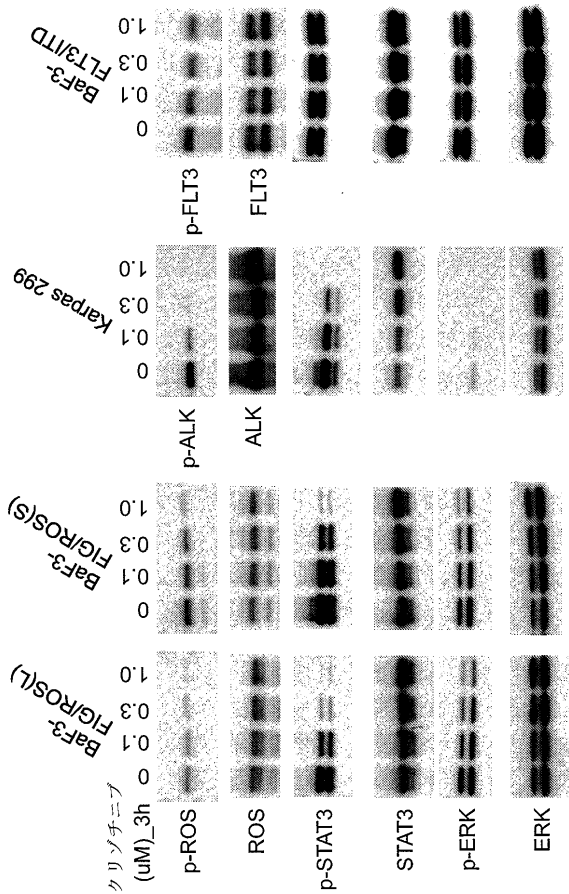


【 21 B 】

クリゾチニブ



【 22 】



【配列表】

0006210977000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 ハーバート・ハーク
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 9 8 2 . サウスハミルトン . エコーコーブロード 1 3 8
- (72)発明者 ティン - レイ・グ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 8 0 1 . ウォーバン . ミカイラウェイ 7
- (72)発明者 アイラン・グオ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 4 2 1 . レキシントン . スクールストリート 8 3
- (72)発明者 アンソニー・ポール・ポッセマト
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 6 0 5 . ウースター . ネプチューンロード 3 2
- (72)発明者 キャサリン・エレノア・クロスビー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 9 4 9 . ミドルトン . カブラルドライブ 3 8
- (72)発明者 メーガン・アン・タッカー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 9 7 0 . セーレム . ジャポニカストリート 2 5
- (72)発明者 シンシア・リーヴス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 9 1 5 . ビバリー . ハスケルストリート 2 . アパートメン
ト 2

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 0 / 0 9 3 9 2 8 (W O , A 2)
特表 2 0 1 2 - 5 1 7 2 4 5 (J P , A)
特表 2 0 1 1 - 5 0 1 6 6 9 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 1 2 8 6 5 9 (W O , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 2 8 8 2 4 0 (U S , A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	肺癌中的ROS激酶		
公开(公告)号	JP6210977B2	公开(公告)日	2017-10-11
申请号	JP2014512072	申请日	2012-05-23
申请(专利权)人(译)	细胞信号传导科技股份有限公司莱特每次		
当前申请(专利权)人(译)	细胞信号传导科技股份有限公司莱特每次		
[标]发明人	ヴィクトリアマクギネスリムクナス ハーバートハーク テインレイグ アイラングオ アンソニーポールポッセマト キャサリンエレノアクロスビー メーガンアンタッカー シンシアリーヴス		
发明人	ヴィクトリア・マクギネス・リムクナス ハーバート・ハーク テイン・レイ・グ アイラン・グオ アンソニー・ポール・ポッセマト キャサリン・エレノア・クロスビー メーガン・アン・タッカー シンシア・リーヴス		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/53 A61P35/00 A61P11/00 A61P43/00 A61K45/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156 G01N33/57423 G01N2333/912 A61P11/00 A61P35/00 A61P43/00		
FI分类号	G01N33/574.A C12Q1/68.ZNA.A G01N33/533 G01N33/535 G01N33/53.M A61P35/00 A61P11/00 A61P43/00.111 A61K45/00 C12N15/00.A		
优先权	13/113676 2011-05-23 US		
其他公开文献	JP2014517297A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了鉴定在哺乳动物肺癌中具有ROS激酶活性的多肽的存在。在一些实施方案中，具有ROS激酶活性的多肽是编码ROS的多核苷酸与编码第二（非ROS）多肽的多核苷酸的融合的结果。描述了ROS的三种不同融合伴侣，由FIG基因，SLC34A2基因和CD74基因编码的蛋白质。本发明提供了一种确定生物样品中具有ROS激酶活性的多肽的存在的新方法，筛选抑制该蛋白质的化合物的方法以及抑制癌症（例如肺癌）进展的方法，到。

(45) 発行日 平成29年10月11日(2017.10.11)

(24) 登録日 平成29年9月22日(2017.9.22)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N	33/574	A
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68	Z N A A
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N	33/533	
GO 1 N 33/535 (2006.01)	GO 1 N	33/535	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N	33/53	M

請求項の数 25 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-512072 (P2014-512072)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月23日 (2012.5.23)
 (65) 公表番号 特表2014-517297 (P2014-517297A)
 (43) 公表日 平成26年7月17日 (2014.7.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/039108
 (87) 国際公開番号 W02012/162373
 (87) 国際公開日 平成24年11月29日 (2012.11.29)
 審査請求日 平成27年5月14日 (2015.5.14)
 (31) 優先権主張番号 13/113,676
 (32) 優先日 平成23年5月23日 (2011.5.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501087490
 セル・シグナリング・テクノロジー・イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州
 0 1 9 2 3 ダンヴァース トラスト・レー
 ン 3
 (74) 代理人 100127926
 弁理士 結田 純次
 100140132
 弁理士 竹林 則幸
 (72) 発明者
 ヴィクトリア・マクギネス・リムクナス
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 1 8
 6 7 . リーディング・グローヴストリート
 5 7

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脚座における ROS キナーゼ