(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6619070号
(P6619070)
(45)発行日　令和1年12月11日(2019.12.11)　(24)登録日　令和1年11月22日(2019.11.22)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/574	***(2006.01)***	G01N	33/574	ZNAA
G01N 33/48	*(2006.01)*	G01N	33/48	M
G01N 33/53	*(2006.01)*	G01N	33/53	M
G01N 33/543	*(2006.01)*	G01N	33/53	Y
C07K 19/00	*(2006.01)*	G01N	33/543	545A

請求項の数 12　外国語出願　(全 79 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-169294 (P2018-169294)
(22)出願日　平成30年9月11日 (2018.9.11)
(62)分割の表示　特願2017-173626 (P2017-173626)の分割
原出願日　平成24年5月23日 (2012.5.23)
(65)公開番号　特開2019-23645 (P2019-23645A)
(43)公開日　平成31年2月14日 (2019.2.14)
審査請求日　平成30年9月11日 (2018.9.11)
(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・地域又は機関
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　０１９２３　ダンヴァーズ　トラスク・レーン　３
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　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０１８６７．リーディング．グローヴストリート５７

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】
ヒト非小細胞肺癌腫（ＮＳＣＬＣ）または疑われるＮＳＣＬＣ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又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記試薬は抗体である、請求項１～３のいずれか1項に記載の方法。
【請求項５】

フロー・サイトメトリー・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１～４のいずれか1項に記載の方法。

【請求項６】

前記方法が、ＩＨＣアッセイで実行される請求項５に記載の方法。

【請求項７】

ヒト非小細胞肺癌腫（ＮＳＣＬＣ）患者由来の生物学的サンプル中のＦＩＧ－ＲＯＳ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、検出には、

（ｉ）ＰＣＲアッセイ、
（ｉｉ）蛍光ｉｎ－ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）アッセイ、
（ｉｉｉ）核酸ハイブリダイゼイション、又は
（ｉＶ）核酸配列決定
を実行する、方法。

【請求項８】

検出には、ＦＩＧ－ＲＯＳ融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの融合接合部にハイブリダイズする核酸を使用して、核酸ハイブリダイゼイションを実行することを含む、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

核酸は、ＦＩＧ－ＲＯＳ融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの融合接合部を含む１５ポリペプチドを含む、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

ＦＩＧ－ＲＯＳ融合ポリペプチドは、配列番号：５８、配列番号：５６、又は配列番号：６０から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項８又は９に記載の方法。

【請求項１１】

ポリヌクレオチドは、配列番号：５７、配列番号：５５、又は配列番号：５９から選択されるヌクレオチド配列を含む、請求項８又は９に記載の方法。

【請求項１２】

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７～１１のいずれか1項に記載の方法。

【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）に関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関する。

【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、ＢＣＲ－ＡＢＬ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（ＣＭＬ）を駆動する。ＣＭＬ症例の少なくとも９０～９５％において見出されるＢＣＲ－ＡＢＬ癌タンパク質は、第９染色体上のｃ－ＡＢＬプロテイン・チロシン・キナーゼ由来の遺伝子配列の、第２２染色体上のＢＣＲ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（ＡＬＬ）お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】

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関与している。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。

【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。

【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）

【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】
【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。
【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）。
【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。
【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、ｉｎｖｉｔｒｏ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。
【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】

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】

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】

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。

【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】

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、ＣＨ５４２４８０２、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。

【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。

【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。

【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。

【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、ＡＬＫ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。

【００３１】

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。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。

【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、ＮＳＣＬＣまたはＳＣＬＣである。いくつかの実施形態において、ＲＯＳ阻害性治療剤またはＡＬＫ阻害性治療剤は、ＰＦ－０２３４１０６６、ＮＶＴ　ＴＡＥ－６８４またはＡＰ２６１１３である。いくつかの実施形態において、ＲＯＳ阻害性治療剤またはＡＬＫ阻害性治療剤は、ＡＰ２６１１３、ＣＥＰ－１４０８３、ＣＥＰ－１４５１３、ＣＥＰ１１９８８、ＣＨ５４２４８０２、ＷＨＩ－Ｐ１３１およびＷＨＩ－Ｐ１５４である。

【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、ＲＯＳ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、ＲＯＳ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。

【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ＲＯＳよりもかなり小さい分子量を有するＲＯＳの形態の発現を示す、ヒトＮＳＣＬＣ細胞株（ＨＣＣ７８）由来の抽出物のウエスタン・ブロット分析を示す図である。

【図２】ヒトＮＳＣＬＣ細胞株における変異体ＲＯＳキナーゼのｓｉＲＮＡ阻害を示す図

である：パネルＡは、ｓｉＲＮＡ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、ＲＯＳ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ＲＯＳ駆動細胞株中）を示すイムノブロットであり、パネルＣは、ＲＯＳ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ブロットである。

【図３Ａ】それぞれ染色体４ｐおよび６ｑ上のＳＬＣ３４Ａ２遺伝子およびＲＯＳ遺伝子の位置を示す図である。

【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バリア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バリア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バリア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ア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ア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）；転座に関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）バリアント転座に関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）バリアント転座に関与する残基であり、下線付きの太字の赤色残基は、予測された（非常に短い）バリアント転座に関与する残基である。

【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）バリアント転座に関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）バリアント転座に関与する残基であり、下線付きの太字の大文字残基は、（非常に短い）バリアント転座に関与する残基である。

【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）バリアント）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）；転座に関与する残基に下線を付している。
【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転座に関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転座に関与する残基に下線を付している。
【図１１Ｂ－２】図１１Ｂ－１の続き。
【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、ＲＯＳ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。ＲＯＳ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。
【図１４】Ａ～Ｂは、２色ブレイク－アーパート（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。
【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。
【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（「ｓｂｊｔ」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。
【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、０．０３Ｍ、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グラフを示す図である。
【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、０．０３Ｍ、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グラフを示す図である。
【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。
【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ので、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、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アントが存在する（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。

【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。

【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α－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。

【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タンパク質のバリアントまたは種々の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。
【００５３】
いくつかの実施形態において、バリアントは、「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。類似のバリアントは、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。
【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ない）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。
【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（１

９８９年）に記載されている。

【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、３２Ｐ）、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化学結合（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、1×10^{-6}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、1×10^{-7}Ｍ以下のK_D、または1×10^{-8}Ｍ以下のK_D、または1×10^{-9}Ｍ以下のK_D、または1×10^{-10}Ｍ以下のK_D、または1×10^{-11}Ｍ以下のK_D、または1×10^{-12}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、１ｐＭ～５００ｐＭ、または５００ｐＭ～１μＭの間、または１μＭ～１００ｎＭの間、または１００ｍＭ～１０ｎＭ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、ＳＬＣ

３４Ａ２、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（７５０ｍＭＮａＣｌ、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℃での一晩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。

【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。

【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．Ｗｒｏｓｅｒら、Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２６巻：４０３～１１頁（１９８９年）；Ｍｏｒｒｉｓｉｏｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１巻：６８５１頁（１９８４年）；Ｎｅｕｂｅｒｇｅｒら、Ｎａｔ

ｕｒｅ　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。

【００６７】

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／および治療効能を提供する。

【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アントの定常領域または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アントの定常領域またはＦｃ領域を有する抗体は、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アント抗体は、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。

【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】

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。

【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　Ｌａｂｏｒａ

ｔｏｒｙ（１９８８年）；Ｃｚｅｒｎｉｋ、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。

【００７４】

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　Ｓｉｎｓ、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）充分な時間の後、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髄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。

【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・バリアント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）；Ｓｐｉｒａ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、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）。

【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$Ｃ_{1}$－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。

【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、２０１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・ブロッティ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。

【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ーと並べて、ウエスタン・ブロッティ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。

【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。

【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。

【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）、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されて、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されて、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；Ｔｒａｕｎｅｃｋｅｒ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．１００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、２５０ｆｍｏｌ）、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、ヘプシン）、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。

【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^{2}Ｈ、^{13}Ｃ、^{15}Ｎ、^{17}Ｏ、^{18}Ｏまたは^{34}Ｓ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。

【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従っても特徴付けられる。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（ＭＳ^{n}）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充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。

【００９７】

ＭＳ／ＭＳおよびＭＳ^{3}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。

【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。

【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ＭＳ^{n}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、Ｇｙｇｉら、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。

【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）の短いバリアント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（Ｇｙｇｉら、Ｇｅｒｂｅｒら、上記を参照のこと）。

【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も少ない。例えば、Ｇｅｙｓｅｎら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８１巻：３９９８～４００２頁（１９８３年）を参照のこと。

【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)	*VGV*WHR	62
SLC34A2-ROS (短い)	*LVG*DDF	63
SLC34A2-ROS (長い)	*LVG*AGV	64
CD74-ROS	*PPK*DDF	65
FIG-ROS (短い)	*AGS*TLP	66
FIG-ROS (長い)	*LQV*WHR	67
FIG-ROS (余分に長い)	*VLQAGV*	68

【０１０５】

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。

【０１０６】

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。

【０１０７】

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

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）。

【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ＣｅｌｌＳｅａｒｃｈ（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。

【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。

【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。

【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

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）。

【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）。

【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。

【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。

【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、

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応答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、イムノ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】

イムノアッセイ

本発明の方法の実施において有用なイムノアッセイは、均一系イムノアッセイまたは不均一系イムノ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

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。

【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、「Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｒｉｃ Ａｓｓａｙｓ 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。

【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、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、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。

【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

（ＩＨＣ）または免疫蛍光（ＩＦ）アッセイ形式で実施される。

【０１２８】

フロー・サイトメトリー（ＦＣ）は、ＲＯＳ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に、哺乳動物腫瘍中のＲＯＳ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、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ＲＯＳ特異的抗体またはＲＯＳ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ＲＯＳまたはＲＯＳ融合ポリペプチドのレベルを同定する。ＲＯＳ阻害性治療剤による腫瘍の処置後の同様の分析は、ＲＯＳキナーゼの標的化インヒビターに対する全長ＲＯＳ発現腫瘍またはＲＯＳ融合ポリペプチド発現腫瘍の応答性を明らかにする。

【０１２９】

免疫組織化学（ＩＨＣ）染色もまた、ＲＯＳ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に、哺乳動物癌（例えば肺癌）中のＲＯＳキナーゼ活性を有するポリペプチドの発現および／または活性化状態を決定するために使用され得る。ＩＨＣ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ＰＢＳ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、ＲＯＳ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。

【０１３０】

免疫蛍光（ＩＦ）アッセイもまた、ＲＯＳ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に、哺乳動物癌中のＲＯＳキナーゼ活性を有するポリペプチド（例えば、全長ＲＯＳポリペプチドまたはＲＯＳ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。ＩＦ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、ＲＯＳキナーゼ活性を有するポリペプチド（例えば、ＣＤ７４－ＲＯＳ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Ａｌｅｘａ４８８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。

【０１３１】
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（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、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（ＦＡＣＳ）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。

【０１３２】
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。

【０１３３】
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され得る。

【０１３４】
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（ＰＰＦＥ）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。

【０１３５】
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）の発現が疾患と相関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。

【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ェンシー（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。
【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・ブロッティング・プローブもしくはノーザン・ブロッティング・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。
【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・ブ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。
【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

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／または定量のために、あまりストリンジェント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の速度は、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）中に見出され得る。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

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（Ｇａｔｔｉら、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さ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

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

、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。

【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。

【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。

【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。

【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

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。

【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。

【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。

【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。

【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

－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；Ｔｒｉｎｅｉ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。

【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。

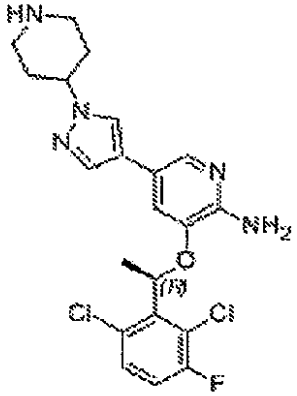
【０１６６】

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、その特性は充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。

【０１６７】

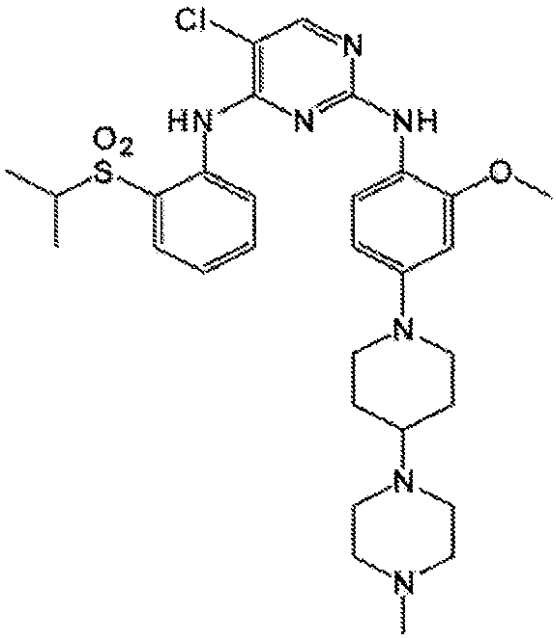
ＰＦ－０２３４１０６６は、構造：

【化２】



を有し、構造：

【化３】



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は、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。

【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。

【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のα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。ヒト化標的特異的抗体の生成、スクリーニングおよび治療的使用は、充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。

【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

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ＥＰ１４２３４２８号を参照のこと。

【０１７１】

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。

【０１７２】

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ＥＰ１４２３４２８号を参照のこと。

【０１７３】

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。

【０１７４】

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。

【０１７５】

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。

【０１７６】

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、充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

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）ＳＭＡＲＴｓｅｌｅｃｔｉｏｎ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。

【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。

【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。

【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。

【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；Ｃｈｕら（１９８７年）、Ｎｕｃｌ．ＡｃｉｄｓＲｅｓ．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

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、充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充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未満の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ＥＧＦＲ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、膣内および局所（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。

【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。

【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。

【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、Ａｋｂｔａｒ、１９９５年、Ｍａｕｒｅｒら、１９９９年、Ｍｏｌ．Ｍｅ

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ミ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ＷＯ９９／３　１２６２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はならない。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）ミクロスフェア（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

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。

【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。

【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。

【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

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。

【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化学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。

【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）を少なくとも使用して決定される。

【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得る（ＥＧＦＲまたはＰＤＧＦＲなどの他の標的とは逆に）。

【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

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。

【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。

【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、充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、充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：

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、当業者に明らかな、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.、Ｄａｎｖｅｒ、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　β－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。

【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　C_{18}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　Na_2HPO_4、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ビーズで、プロテインＧアガロース・ビーズ（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

された抗体（４０μｌ、１６０μｇ）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、ｄｄH_2Oで２回洗浄した。ペプチドを、４０μｌ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（４０μｌ）中のペプチドを、Ｓｔｏｐ　ａｎｄ　Ｇｏ抽出チップ（ＳｔａｇｅＴｉｐｓ）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、１μｌの６０％ＭｅＣＮ、０．１％ＴＦＡを用いて、マイクロカラムから、７．６μｌ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１０ｃｍ×７５μｍ　ＰｉｃｏＦｒｉｔキャピラリー・カラム（Ｎｅｗ　Ｏｂｊｅｃｔｉｖｅ）上にロードした。カラムを、２８０ｎｌ／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）。

【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。

【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．２７、ｒｅｖ．１２）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ＣｒｅａｔｅＤｔａ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。エラスタ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。

【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

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（Ｃａｒｒら、Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　３巻：５３１～５３３頁（２００４年）を参照のこと）。しかし、免疫親和性ストラテジーは、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ク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ク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ク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ストラテジー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）。ＲＯＳキナーゼを含めて、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 β－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】

【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	GLAAGVGLANACyAIHTLPTQEEIENLPAFPR	35	1	1
ROS	P08922	2110	DIyKNDYYR; DIyKNDYyR; DIyKNDyYR; DIyKNDyyRKRGEGLLPVR	36; 37	12	4
ROS	P08922	2114	DIYKNDyYR; DIyKNDyYR; DIyKNDyyRKRGEGLLPVR	36; 37	11	3
ROS	P08922	2115	DIyKNDYyR; DIyKNDyyRKRGEGLLPVR	36; 37	1	1
ROS	P08922	2274	EGLNyMVLATECGQGEEK; NREGLNyMVLATECGQGEEK; EGLNyMVLATECGQGEEKSEGPLGSQESESCGLR; NREGLNyMVLATECGQGEEKSEGPLGSQESESCGLR	38; 39; 40; 41	20	
ROS	P08922	2323	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD; QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyGDGSD; QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGYGDGSD	42	4	1
ROS	P08922	2334	QVAYCPSGKPEGLNyACLTHSGYGDGSD; QVAYCPSGKPEGLNyACLTHSGyGDGSD; QVAyCPSGKPEGLNyACLTHSGYGDGSD	42	7	2
ROS	P08922	2342	QVAyCPSGKPEGLNYACLTHSGyGDGSD		3	
IRS-1	P35568	612	GGHHRPDSSTLHTDDGyMPMSPGVAPVPSGR	43		1
IRS-1	P35568	632	KGSGDyMPMSPK	44	2	1
IRS-1	P35568	662	VDPNGyMMMSPSGGCSPDIGGGPSSSSSSSNAVPSGTSYGK	45	3	
IRS-2	Q9Y4H2	598	QRPVPQPSSASLDEyTLMR	46		1
IRS-2	Q9Y4H2	653	SSSSNLGADDGyMPMTPGAALAGSGSGSCR	47	4	5
IRS-2	Q9Y4H2	675	SDDyMPMSPASVSAPK	48	3	4
IRS-2	Q9Y4H2	742	ASSPAESSPEDSGyMR	49	3	3
IRS-2	Q9Y4H2	823	APYTCGGDSDQyVLMSSPVGR; SYKAPYTCGGDSDQyVLMSSPVGR	50	2	5
SLC34A2	O95436	54	IELLPSySTATLIDEPTEVDDPWNLPTLQDSGIK	51	1	1

【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・ブロット分析

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・ブ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。イムノブロッティ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・ブロッティングを、「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】

図１は、ウエスタン・ブ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・ブロットにより、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ブロットした。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】

〔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）；

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

【０２３４】

２×１０^{5}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】

イムノブロット分析により、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

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、２．５μｇ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 ＩＩ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：ＡＣＣＣＴＴＣＴＣＧＧＴＴＣＴＴＣＧＴＴＴＣＣＡ（配列番号９）

ＲＯＳ－ＧＳＰ２：ＧＣＡＧＣＴＣＡＧＣＣＡＡＣＴＣＴＴＴＧＴＣＴＴ（配列番号１０）

ＲＯＳ－ＧＳＰ３：ＴＧＣＣＡＧＡＣＡＡＡＧＧＴＣＡＧＴＧＧＧＡＴＴ（配列番号１１）

ＳＬＣＲＯＳ－Ｆ１：ＴＣＣＡＴＣＣＣＡＧＣＡＣＣＴＧＣＧＧＡＧ（配列番号１８）

ＳＬＣＲＯＳ－Ｒ１：ＣＴＣＡＡＣＴＣＴＣＴＡＴＴＴＣＣＣＡＡＡＣＡＡＣＧＣ（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

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つのバリアント融合タンパク質（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アント、非常に短いバリアントが予測された（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。

【０２４１】

予測されたＳＬＣ３４Ａ２－ＲＯＳ（ＶＳ）（即ち、非常に短いバリアント）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（長いバリアント、アミノ酸配列は上、核酸配列は下）および図４Ｂ（短いバリアント、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、転座に関与する残基は下線である。

【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、長いバリアントに関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）バリアント転座に関与する残基であり、下線付きの太字の赤色残基は、予測された（非常に短い）バリアント転座に関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。

【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アントをコードする上記ｃＤＮＡ構築物でトランスフェクトした。

【０２４６】

上記ＳＬＣ３４Ａ２－ＲＯＳ　ｃＤＮＡ構築物（長いバリアント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（Ｑｉａｑｅｎ、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（長いバリアント）の発現を確認した（図７を参照のこと）。

【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。

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、Ｃａｒｓｌｂａｄ、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。Ｓｃｈｗａｌｌｅｒ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。

【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・ブ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

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】

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：ＡＣＣＣＴＴＣＴＣＧＧＴＴＣＴＴＣＧＴＴＴＣＣＡ（配列番号９）

ＲＯＳ－ＧＳＰ２：ＧＣＡＧＣＴＣＡＧＣＣＡＡＣＴＣＴＴＴＧＴＣＴＴ（配列番号１０）

ＲＯＳ－ＧＳＰ３：ＴＧＣＣＡＧＡＣＡＡＡＧＧＴＣＡＧＴＧＧＧＡＴＴ（配列番号１１）

ＣＤ７４－Ｆ１：ＧＣＡＧＡＡＴＧＣＣＡＣＣＡＡＧＴＡＴＧＧＣＡＡ（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）。

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否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diH_2O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％H_2O_2中で１０分間クエンチし、次いでdiH_2O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、ＳｉｇｎａｌＳｔａｉｎ（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

ＯＳ１（Ｄ４Ｄ６）ＸＰ（商標）Ｒａｂｂｉｔ　ｍＡｂと共に４℃で一晩インキュベートした。ＴＢＳＴ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、Ｅｎｖｉｓｉｏｎｐｏｓｉｔｉｖｅ（Ｄａｋｏ、Ｃａｒｐｉｎｔｅｒｉａ、ＣＡ）またはＳｉｇｎａｌＳｔａｉｎ（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。ＳｉｇｎａｌＳｔａｉｎ（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、ＴＢＳＴ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。

【０２５９】

スライドを１分間発色させ、次いでｄｉH_2O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、ｄｉH_2O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ｄｉH_2O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（２０×）を獲得した。

【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。

【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。

【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

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。

【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、６０×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、４０×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。

【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。

【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だ。しかし、ＮＳＣＬＣの世界中での高い発生率（米国単独で毎年１５１，００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】

〔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３２３Ｏ１７　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、３２３Ｏ１７　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：３×１０μｍの切片由来のＲＮＡを、標準

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を使用して、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）

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

ＦＩＧ－Ｆ３：ＧＣＴＧＴＴＣＴＣＣＡＧＧＣＴＧＡＡＧＴＡＴＡＴＧＧ（配列番号５３）

ＦＩＧ－Ｆ７：ＧＴＡＡＣＣＣＴＧＧＴＧＣＴＡＧＴＴＧＣＡＡＡＧ（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、本明細書中に記載されるＲＯＳキナーゼ活性を有するタンパク質である。

【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。

【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バリアント（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アントもまた、ＮＳＣＬＣにおいて見出され得る。

【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、Ｃｏｏｌｓら、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３４８巻：１２０１～１２１４頁（２００３年）を参照のこと。

【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。

【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。

【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。

【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。

【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】

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、０ｎＭ、３ｎＭ、１０ｎＭ、３０ｎＭ、１００ｎＭ、３００ｎＭまたは１０００ｎＭのＴＡＥ－６８４を含む培地１ｍＬ中で成長させた。７２時間後、２０μｌ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１００μｌ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４９０ｎｍで吸光度を読み取ることによって計数した。

【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】

【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

【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。

【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１００ｎＭ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

ｅｌｌ 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ＩＧＦｌＲ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ＩＧＦｌＲ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。

【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ので、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。

【０２９３】

次に、０、０．１、０．３または１．０ｕＭ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ＩＧＦｌＲ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ＩＧＦｌＲ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。

【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

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】

【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】

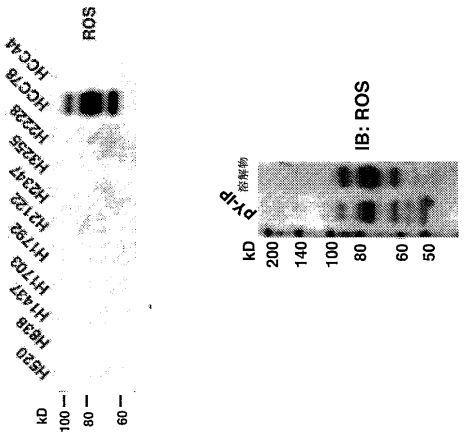
ＩＨＣおよびＦＩＳＨの両方によるヒトＮＳＣＬＣのこのスクリーニングに基づいて、これらの腫瘍におけるＡＬＫおよびＲＯＳの発現が相互に排他的であることが見出された。言い換えると、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、ＡＬＫによって駆動される場合、ＲＯＳを発現しない。同様に、ＮＳＣＬＣ腫瘍は、ＲＯＳによって駆動される場合、ＡＬＫを発現しない。従って、ＲＯＳ活性およびＡＬＫ活性の両方を阻害するクリゾチニブまたはＴＡＥ－６８４などの治療剤は、ＮＳＣＬＣの処置において特に有効である。

【０２９９】

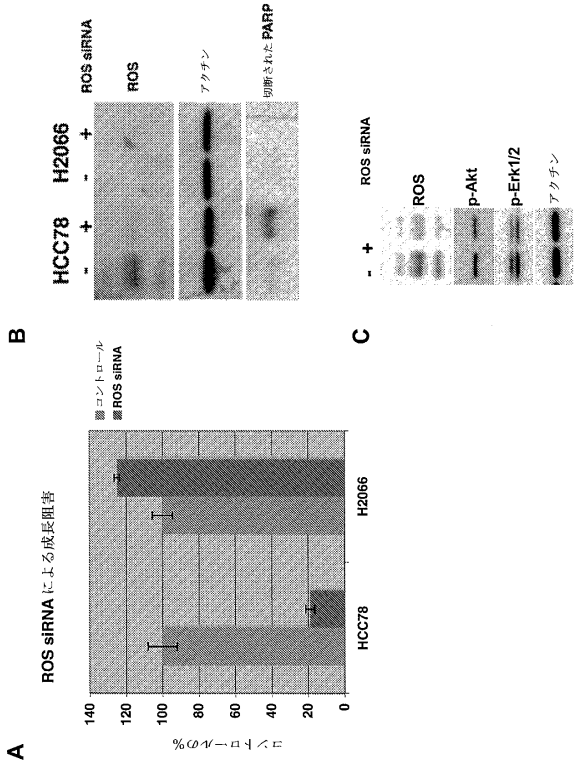
等価物

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。

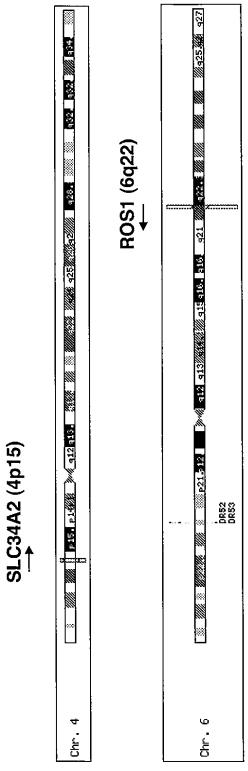
【図１】


ROS
HCC44
HCC78
H2228
H3255
H2347
H2122
H1792
H1703
H1437
H838
H520
kD
100
80
60
IB: ROS
溶解物
pY-IP
kD
200
140
100
80
60
50

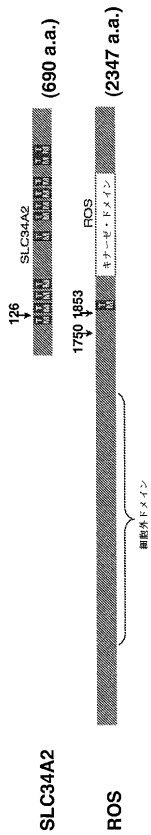
【図２】


A
ROS siRNA による成長阻害
コントロール
ROS siRNA
H2066
HCC78
コントロールの%
140
120
100
80
60
40
20
0
B
HCC78
H2066
ROS siRNA
ROS
アクチン
切断された PARP
C
ROS siRNA
ROS
p-Akt
p-Erk1/2
アクチン

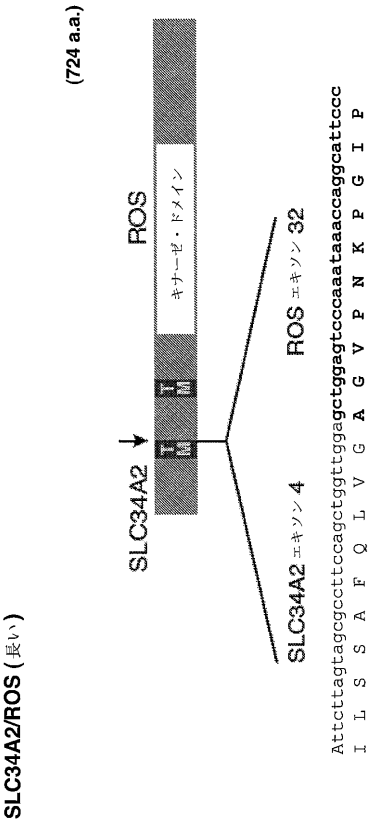
【図３Ａ】


SLC34A2 (4p15)
ROS1 (6q22)
Chr. 4
Chr. 6

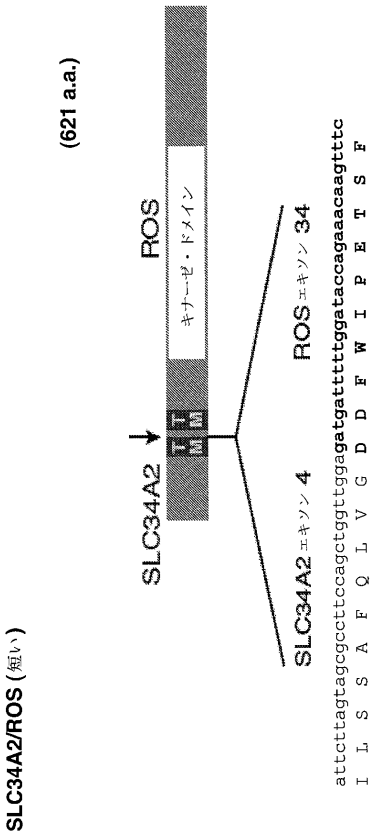
【図３Ｂ】


(690 a.a.)
(2347 a.a.)
SLC34A2
126
ROS
1750
1853
キナーゼ・ドメイン
細胞外ドメイン
SLC34A2
ROS

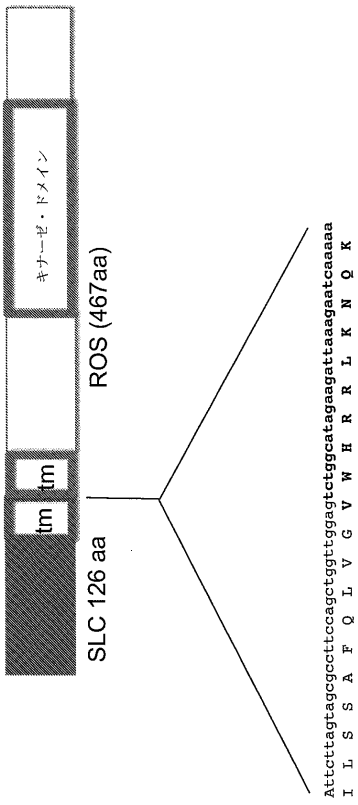
【図３Ｃ】



【図３Ｄ】



【図３Ｅ】



【図４Ａ】

MAPWPELGDAQPWPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTEVDDPWNLPTLQDSGI
KWSERDTKGKILCFFQGIGRLILLLGFLYFFVCSLDILSSAFQLVGAGVPNKPGIPKLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITY
YILEIRKSTSNNLQNQNLRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDFWIPETSFI
LTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAELRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFFRE
KLTLRLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQY
ITLELMEGGDLLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDF
GLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHSNLDVLNYVQTGGRLEPP
RNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVAL
METKNREGLNYMVLATECGQGEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYG
DGSD

atggctccctggcctgaattgggagatgcccagcccaaccccgataagtacctcgaaggggccgcaggtcagcagcccac
tgccccctgataaaagcaaagagaccaacaaaacagataacactgaggcacctgtaaccaagattgaacttctgccgtcct
*actccacggctacactgatagatgagcccactgaggtggatgaccccctggaacctacccactcttcaggactcgggga*tc
aagtggtcagagagagacaccaaagggagattctctgtttcttccaagggattgggagattgattttacttctcggatt
*tctctactttttcgtgtgctcccctggatattcttagtagcgcctttccagctggttggag*ctggagtcccaaataaaccag
gcattcccaaattactagaagggagtaaaaattcaatacagtgggagaaagctgaagataatggatgtagaattacatac
tatatccttgagatagaagaaggagcacttcaaataatttacagaaccagaatttaaggtggaagatgacatttaatggatc
ctgcagtagtgtttgcacatggaagtccaaaaacctgaaaggaatatttcagttcagagtagtagctgcaaataatctag
ggtttggtgaatatagtggaatcagtgagaatattatattagttggagatgatttttggataccagaaacaagtttccata
cttactattatagttggaatatttctggttgttacaatcccactgaccttttgtctggcatagaagattaaagaatcaaaa
aagtgccaaggaaggggtgacagtgcttataaacgaagacaaagagttggctgagctgcgaggtctggcagccggagtag
gcctggctaatgcctgctatgcaatacatactcttccaacccaagaggagattgaaaatcttcctgccttccctcgggaa
aaa**ctgactctgcgtctcttgctgggaagtggagcctttggagaagtgtatgaaggaacagcagtggacatcttaggagt**
tggaagtggagaaatcaaagtagcagtgaagactttgaagaaggttccacagaccaggagaagattgaattcctgaagg
aggcacatctgatgagcaaatttaatcatcccaacattctgaagcagcttggagtttgtctgctgaatgaaccccaatac
attatcctggaactgatggagggaggagaccttcttacttatttgcgtaaagcccggatggcaacgttttatggtccttt
actcaccttggttgaccttgtagacctgtgtgtagatatttcaaaaggctgtgtctacttggaacggatgcatttcattc
acagggatctggcagctagaaattgccttgtttccgtgaaagactataccagtccacggatagtgaagattggagacttt
ggactcgccagagacatctataaaaatgattactatagaaagagagggaaggcctgctcccagttcggtggatggctcc
agaaagtttgatggatggaatcttcactactcaatctgatgtatggtcttttggaattctgatttgggagattttaactc
ttggtcatcagccttatccagctcattccaaccttgatgtgttaaactatgtgcaaacaggagggagactggagccacca
agaaattgtcctgatgatctgtggaatttaatgacccagtgctgggctcaagaacccgaccaaagacctacttttcatag
aattcaggaccaacttcagttattcagaaatttttttcttaaatagcatttataagtccagagatgaagcaaacaacagtg
gagtcataaatgaaagctttgaaggtgaagatggcgatgtgatttgtttgaattcagatgacattatgccagttgcttta
atggaaacgaagaaccgaagaaggttaaactatatggtacttgctacagaatgtggccaaggtgaagaaaagtctgaggg
tcctctaggctcccaggaatctgaatcttgtggtctgaggaaagaagaagaaggaaccacatgcagacaaagatttctgcc
aagaaaaacaagtggcttactgcccttctggcaagcctgaaggcctgaactatgcctgtctcactcacagtggatatgga
gatgggtctgattaa

【図４Ｂ】

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTEVDDPWNLPTLQDSGI
KWSERDTKGKILCFFQGIGRLILLLGFLYFFVCSLDILSSAFQLVGDDFWIPETSFILTIIVGIFLVVFIPLTFVWHRRL
KNQKSAKEGVTVLINEDKELAELRGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREK**LTLRLLLGSGAFGEVYEGTAVD**
ILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMATF
YGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVR
WMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHSNLDVLNYVQTGGRLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRP
TFHRIQDQLQLFRNFFLNSIYKSRDEANNSGVINESFEGEDSDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATECGQGEE
KSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHSGYGDGSD

atggctcccctggcctgaattgggagatgcccagcccaaccccgataagtacctcgaagggqccgcaggtcagcagcccac
tgccccctgataaaagcaaagagaccaacaaaacagataacactgaggcacctgtaaccaagattgaacttctgccgtcct
actccacggctacactgatagatgagcccactgaggtggatgacccctggaacctacccactcttcaggactcggggatc
aagtggtcagagagagacaccaaaggaagattctctgtttcttcccaagggattgggagattgatttacttctcggatt
tctctacttttttcgtgtgctccctggatattcttagtagcgccttccagctggttggagatgattttttgatatccagaaa
caagtttcatactactattatagttggaatatttctggttgttacaatcccactgaccttgtctggcatagaagatta
aagaatcaaaaaagtgccaaggaaggggtgacagtgcttataaacgaagacaaagagttggctgagctgcgaggtctggc
agccgggagtaggcctggctaatgcctgctatgcaatacatactttccaacccaagaggagattgaaaatcttcctgcct
tcccttcgggaaaaactgactctgcgtctcttgctgtgggaagtggagcctttggagaagtgtatgaaggaacagcagtggac
atcttagggagttcggaagtggagaatcaaagtagcagtgaagacttttgaagaagggttccacggacaggagaagatttga
attcctgaaggaggcacatctgatgagcaaatttaatcatccaacatctgaagcagcttggagtttgtctgctgaatg
aaccccaatacattatcctggaactgatggagggaggagacctttcttacttattggcgtaaagcccggatggcaacgttt
tatggtcctttactcaccttggttgaccttgtagacctgtgtgtagatatttcaaaaggctgtgtctacttggaacggat
gcatttcattcacaggggatctggcagctagaaattgccttgtttccgtgaaagactatacagtccacggatagtgaaga
ttggagacttttggactcgccagagacatctataaaaatgattactatagaagagaggggaagccgctgctccagttcgg
tggatggctccagaaagtttgatggatggaatcttcactactcaatctgatgtatggtcttttggaattctgatttggga
gattttaactctggtcatcagccttatccagctcattccaacctgagtgtttaaactatgtgcaaacaggaggggagac
tggagccaccaagaaattgtcctgatgatctgtggaatttaatgaccagtgctgggctcaagaacccgaccaaagacct
actttctcatagaattcaggaccaacttcagttattcagaaatttttttctttaaatagcatttataagtccaggatgaagc
aaacaacagtggagtcataaatgaaagctttgaaggtgaagatggcgatgtgatttgtttgaattcagatgacattatgc
cagttgcttaatggaaacgaagaaccgagaaggttaaactatatggtacttgctacagaatgtggccaaggtgaagaa
aagtctgagggtcctctaggctcccaggaatctgaatcttgtggtctgaggaaagaagagaaggaaccacatgcagacaa
agatttctgccaagaaaaacaagtggcttactgcccttctggcaagcctgaaggcctgaactatgcctgtctcactcaca
gtggatatggagatgggtctgattaa

【図５】

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTDNTEAPVTKIELLPSYSTATLI
DEPTEVDDPWNLPTLQDSGIKWSERDTKGKILCFFQGIGRLILLLGFLYFFVCSLDILSS
AFQLVGGKMAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIGVLVTVLVQSSSTSTSIVVSMVSSSLLTVRA
AIPIIMGANIGTSITNTIVALMQVGDRSEFRRAFAGATVHDFFNWLSVLVLLPVEVATHY
LEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPFTKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKSLVK
IWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKNVTYKENIAKCQHIFVNFHLP
DLAVGTILLILSLLVLCGCLIMIVKILGSVLKGQVATVIKKTINTDFPFPFAWLTGYLAI
LVGAGMTFIVQSSSVFTSALTPLIGIGVITIERAYPLTLGSNIGTTTTAILAALASPGNA
LRSSLQIALCHFFFNISGILLWYPIPFTRLPIRMAKGLGNISAKYRWFAVFYLIIFFFLI
PLTVFGLSLAGWRVLVGVGVPVVFIIILVLCLRLLQSRCPRVLPKKLQNWNFLPLWMRSL
KPWDAVVSKFTGCFQMRCCYCCRVCCRACCLLCGCPKCCRCSKCCEDLEEAQEGQDVPVK
APETFDNITISREAQGEVPASDSKTECTAL

```
   1 cgggccaggt ttccaggctc ggccgccgcc tccatcccag cacctgcgga gggagcgctg
  61 accatggctc cctggcctga attgggagat gcccagccca accccgataa gtacctcgaa
 121 gggccgcag gtcagcagcc cactgccct gataaaagca aagagaccaa caaaacagat
 181 aacactgagg cacctgtaac caagattgaa cttctgccgt cctactccac ggctacactg
 241 atagatgagc ccactgaggt ggatgacccc tggaacctac ccactcttca ggactcgggg
 301 atcaagtggt cagagagaga caccaaaggg aagattctct gtttcttcca agggattggg
 361 agattgattt tacttctcgg attctctact tttttcgtgt gctccctgga tattcttagt
 421 agcgccttcc agctggttgg aggaaaaatg gcaggacagt tcttcagcaa cagctctatt
 481 atgtccaacc ctttgttggg gctggtgatc ggggtgctgg tgaccgtctt ggtgcagagc
 541 tccagcacct caacgtccat cgttgtcagc atggtgtcct cttcattgct cactgttcgg
 601 gctgccatcc ccattatcat gggggccaac attggaacgt caatcaccaa cactattgtt
 661 gcgctcatgc aggtgggaga tcggagtgag ttcagaagag cttttgcagg agccactgtc
 721 catgacttct tcaactggct gtccgtgttg gtgctcttgc ccgtggaggt ggccacccat
 781 tacctcgaga tcataaccca gcttatagtg gagagcttcc acttcaagaa tggagaagat
 841 gccccagatc ttctgaaagt catcactaag ccccttcacaa agctcattgt ccagctggat
 901 aaaaaagtta tcagccaaat tgcaatgaac gatgaaaaag cgaaaaacaa gagtcttgtc
 961 aagatttggt gcaaaacttt taccaacaag acccagatta acgtcactgt tccctcgact
1021 gctaactgca cctcccctc cctctgttgg acggatggca tccaaaactg gaccatgaag
1081 aatgtgacct acaaggagaa catcgccaaa tgccagcata tctttgtgaa tttccacctc
1141 ccggatcttg ctgtgggcac catcttgctc atactctccc tgctggtcct ctgtggttgc
1201 ctgatcatga ttgtcaagat cctgggctct gtgctcaagg ggcaggtcgc cactgtcatc
1261 aagaagacca tcaacactga tttcccctt ccctttgcat ggttgactgg ctacctggcc
1321 atcctcgtcg gggcaggcat gaccttcatc gtacagagca gctcttgttt cacgtcggcc
1381 ttgaccccc tgattggaat cggcgtgata accattgaga gggcttatcc actcacgctg
1441 ggctccaaca tcggcaccac caccaccgcc atcctggccg ccttagccag ccctggcaat
1501 gcattgagga gttcactcca gatcgccctg tgccacttt tcttcaacat ctccggcatc
1561 ttgctgtggt acccgatccc gttcactcgc ctgcccatcc gcatggccaa ggggctgggc
1621 aacatctctg ccaagtatcg ctggttcgcc gtcttctacc tgatcatctt cttcttcctg
1681 atcccgctga cggtgtttgg cctctcgctg gccggctggc gggtgctggt tggtgtgggg
1741 gttcccgtcg tcttcatcat catcctggta ctgtgcctcc gactcctgca gtctcgctgc
1801 ccacgcgtcc tgccgaagaa actccagaac tggaacttcc tgccgctgtg gatgcgctcg
1861 ctgaagccct gggatgccgt cgtctccaag ccagttacgg gcttccagat gcgctcgtgc
1921 tactgctgcc gcgtgtgctg ccgcgcgtgc tgcttgctgt gtggctgccc caagtgctgc
1981 cgctgcagca agtgctgcga ggacttggag gaggcgcagg aggggcagga tgtccctgtc
2041 aaggctcctg agaccttga taacataacc attagcagag aggctcaggg tgaggtccct
2101 gcctcggact caaagaccga atgcacggcc ttgtagggga cgccccagat tgtcagggat
2161 gggggatgg tcattgagtt ttgcatgctc tcctccctcc cacttctgca ccctttcacc
2221 acctcgagga gatttgctcc ccattagcga atgaaattga tgcagtccta aaaaaaaaaa
```

【図６Ａ】

6A

MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLSEPCIQG
CHFWNSVDQKNCALKCRESCEVGCSSAEGAYEEEVLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWK
SANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWTYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYS
PPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKNQKLD
AGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSIITSSSAVQQEEQWLFLSRKTS
LRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVSDLR
IFYRGSGLISSISIDWLYQRMYFIMDELVCVCDLENCSNIEEITPPSISAPQKIVADSYN
GYVFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPQAKRIIYFNDTAQVFMST
FLDGSASHLILPRIPFADVKSFVACENNDFLVTDGKVIFQQDALSFNEFIVGCDLSHIEEF
GFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDIIELFEL
GPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNISGTMLNVPELQSAMKYKVSVRASSPKRPGPW
SEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNSLYYS
DTKGDVFVWLLNGTDISENYHLPSIAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTD
IVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLQTQPWFSGKKVIALTLDL
SDGLLYWLVQDSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSGRLFWING
FRIITTQEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQTSLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEG
NASSFQILWNGPPAVDWGVVFYSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTP
YTYWGKGPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLT
KFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYA
DVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNVVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYYAE
GDSLFLLIHLHNRSSSELFQDSLVFDITVITIDWISRHLYFALKESQNGMQVFDVDLEHKV
KYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQ
QNKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAML
AGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKGNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQPFP
DKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYLVYYAEVNDRKNS
SDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNYYSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEA
VQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTL
LVTRLSGGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHPVTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPL
NVNLIRFWVELQKWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVVYKTGENST
SLPESFKTKAGVPNKPGIPKLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNNLQNQN
LRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDFWIPET
SFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAELRGLAAGVGLAN
ACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREKLTLRLLLGSGAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVK
TLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRK
ARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKI
GDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQ
PYPAHSNLDVLNYVQTGGRLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQNQLQLFRN
FFLNSIYQCRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVVLMETKNREGLNYMVLATE
CGQGEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHS
GYGDGSD

（下線、太字および赤字の文字列は、３つの異なる融合タンパク質を区別している。）

【図６Ｂ－１】

6B

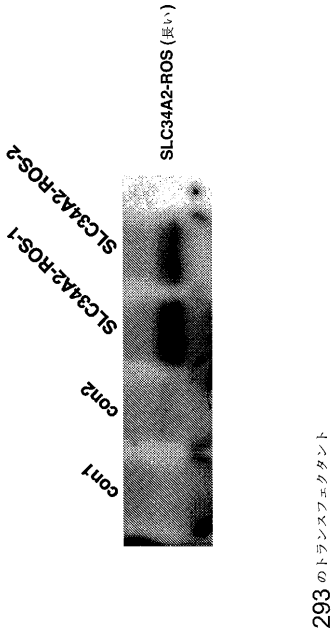
```
   1 caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattattt caaaaggcaa
  61 gtatatccta atatagcaaa acaaacaaag caaaatccat cagctactcc tccaattgaa
 121 gtgatgaagc ccaaataatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa
 181 atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaatttt
 241 tgcaactctt ggctgcctat ggatttctgt ggtgcagtgt acagtttttaa atagctgcct
 301 aaagtcgtgt gtaactaatc tgggccagca gcttgacctt ggcacaccac ataatctgag
 361 tgaaccgtgt atccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgcttt
 421 aaagtgtcgg gagtcgtgtg aggttggctg tagcagcgcg gaaggtgcat atgaagagga
 481 agtactggaa aatgcagacc taccaactgc tccttcagtt gaagccacaa
 541 tatgacatta cgatggaaat ctgcaaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtggaa
 601 atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt
 661 ggtcaagccc ctgcacccct tcactgagta cattttccga gtggtttgga tcttcacagc
 721 gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagg actcatcctc atggagttcc
 781 tgaaactgca cctttgatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggaagtcag
 841 ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgatcag
 901 caaaaatcaa aaattagatg cagggacaca gagaaccagt ttccagtttt actccacttt
 961 accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaaat gaagttggtg agtgtccaga
1021 agcagaatct agtattacca cttcatcttc agcagttcaa caagaggaac agtggctctt
1081 tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atctttaaaa catttagtag atgaagcaca
1141 ttgcctttcgg ttggatgcta tataccataa tattacagga atatctgttg atgtccacca
1201 gcaaattgtt tatttctctg aaggaactct catatgggcg aagaaggctg ccaacatgtc
1261 tgatgtatct gacctgagaa ttttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat
1321 agattggctt tatcaaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt
1381 agaggaactg tcaaacatcg aggaaattac tccaccctct attagtgcac ctcaaaaaat
1441 tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttaccttcctg agagatggca tttatagagc
1501 agaccttcct gtaccatctg gccggtgtgc agaagctgtg cgtattggag agagttgcac
1561 gttaaaggac tttgcaatca agccacaagc caagcgaatc atttacttca atgacactgc
1621 ccaagtcttc atgtcaacat ttctggatgg ctctgcttcc catctcatcc tacctcgcat
1681 ccccttttgct gatgtgaaaa gttttgcttg tgaaaacaat gacttttctg tcacagatgg
1741 caaggtcatt ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcatcgtgg gatgtgacct
1801 gagtcacata gaagaatttg ggtttggtaa cttggtcatc tttggctcat cctcccagct
1861 gcacccctctg ccaggccgcc cgcaggagct ttcggtgctg ttttggctctc accaggctct
1921 tgttcaatgg aagcctcctg cccttgccat aggagccaat gtcatcctga tcagtgatat
1981 tattgaactc tttgaattag gcccttctgc ctggcagaac tggcacttatg aggtgaaagt
2041 atccacccaa gacctcctg aagtcactca tattttcttg aacataaagtg gaaccatgct
2101 gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaaggtt tctgtgagag caagttctcc
2161 aaagaggcca ggccccctggt cagagccctc agtgggtact accctggtgc cagctagtga
2221 accaccattt atcatggctg tgaaagaaga tgggctttgg agtaaaccat tgaataagct
2281 tggccccagga gagttcttat cctctgatat aggaaatgtg tcagacatgg attggtataa
2341 caacagcctc tactacagtg acacgaaagg cgacgttttt gtgtggctgc tgaatgggac
2401 ggatatctca gagaattatc acctacccag cattgcagga gcaggggctt tagcttttga
2461 gtggctgggt cactttctct actgggctgg aaagacatat gtatacaaaa ggcagtctgt
2521 gttgacggga cacacagaca ttgttaccca cgtgaagcta ttggtgaatg acatggtggt
2581 ggattcagtt ggtggatatc tctactggac cacactctat tcagtggaaa gcaccagact
2641 aaatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttgg tttttctggga aaaaggtaat
2701 tgctctaact ttagacctca gtgatgggct cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg
2761 tattcacctg tacacagctg ttcttcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga
2821 atttgcagcc tggagtactt ctgaaatttc ccagaatgca ctgatgtact atagtggtcg
2881 gctgttctgg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaataggtc agaaaaccag
2941 tgtctctgtt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catccctttaa
3001 gcccctgcca gggaactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg ttcaagagtc
3061 ttcattttagg attgaaggaa atgcttcaag ttttcaaatc ctgtggaatg gtcccccgc
3121 ggtagactgg ggtgtagttt tctacagtgt agaatttagt gctcattcta agttctttggc
3181 tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgcctatt
3241 taatctttct gtcactcctt atacctactg gggaaagggc cccaaaacat ctctgtcact
3301 tcgagcacct gaaacagttc catcagcacc agagaacccc agaatattta tattaccaag
3361 tggaaaatgc tgcaacaaga atgaagttgt ggtggaattt aggtggaaca aacctaagca
3421 tgaaaatggg gtgttaacaa aatttgaaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac
3481 aaacaaaaca tgtgaagact ggatttgctgt caatgtcact ccctcagtga tgtctttca
3541 acttgaaggc atgagtccca gatgctttat tgccttccag gttagggcct ttacatctaa
3601 ggggccagga ccatatgctg acgttgtaaa gtctacaaca tcagaaatca acccatttcc
3661 tcacctcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt
3721 tgtgtggacg ttttcagcag aaagagttat cagtgccgtt tgctacacag ctgataatga
```

【図６Ｂ－２】

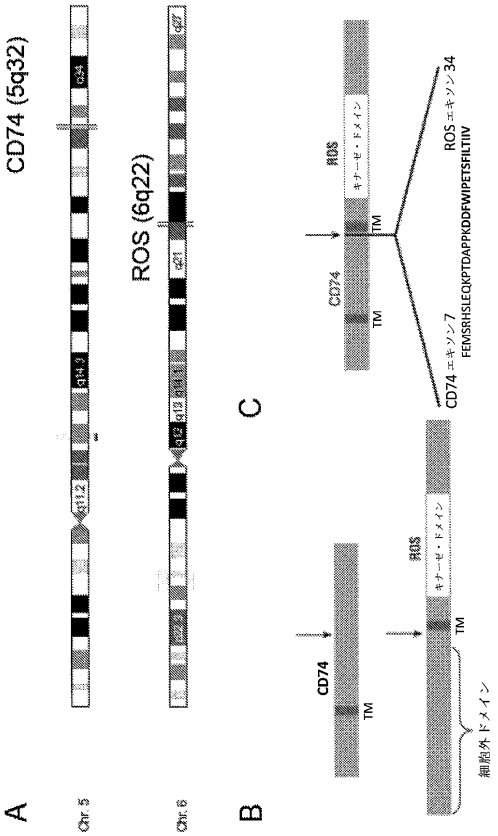
6B (続き)

```
3781 gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttcttctg cacttgcaca atcgctctag
3841 ctctgagctt ttccaagatt cactggtttt tgatatcaca gttattacaa ttgactggat
3901 ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaat ggaatgcaag tatttgatgt
3961 tgatcttgaa cacaaggtga aatatcccag agaggtgaag attcacaata ggaattcaac
4021 aataatttct ttttctgtat atcctctttt aagtcgcttg tattggacag aagtttccaa
4081 ttttggctac cagatgttct actacagtat tatcagtcac accttgcacc gaattctgca
4141 acccacagct acaaaccaac aaaacaaaag gaatcaatgt tcttgtaatg tgactgaatt
4201 tgagttaagt ggagcaatgg ctattgatac ctctaaccta gagaaaccat tgatatactt
4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgtcagtgtt ggagagttat
4321 cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttgttagc ttaactgtgg atggagatct
4381 tatatactgg atcatcacag caaaggacag cacacagatt tatcaggcaa agaaaggaaa
4441 tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagtagg catatcttgg cttacagttc
4501 agttatgcag ccttttccag ataaagcgtt tctgtctcta gcttcagaca ctgtggaacc
4561 aactatactt aatgccacta acactagcct cacaatcaga ttacctctgg caaagacaaa
4621 cctcacaatgg tatggcatca ccagcctcac tccaacatac ctggtttatt atgcagaagt
4681 taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat
4741 agctcttatt gaagatttac aaccattttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa
4801 ttattattca gatcctttgg aacatttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa
4861 aaatggagta ccagaggcag tgcagctcat taatacaact gtgcggtcag acaccagcct
4921 cattatatct tggagagaat ctcacaagcc aaatggacct aaagaatcag tccgttatca
4981 gttggcaatc tcacacctgg ccctaattcc tgaaactcct ctaagacaaa gtgaatttcc
5041 aaatggaagg ctcactctcc ttgttactag actgtctggt ggaaatattt atgtgttaaa
5101 ggttcttgcc tgccactctg aggaaatgtg gtgtacagag agtcatcctg tcactgtgga
5161 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttggttcca gagaacacta gtttgcaatt
5221 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagattt tgggttgagc tacagaagtg
5281 gaaatacaat gagttttacc atgttaaaac ttcatgcagc caaggtcctg cttatgtctg
5341 taatatcaca aatctacaac cttatacttc atataatgtc agagtagtgg tggtttataa
5401 gacgggagaa aatagcacct cacttccaga aagctttaag acaaaagctg gagtcccaaa
5461 taaaccaggc attcccaaat tactagaagg gagtaaaaat tcaatacagt gggagaaagc
5521 tgaagataat ggatgtagaa ttacatacta tatccttgag ataagaaaga gcacttcaaa
5581 taatttacag aaccagaatt taaggtggaa gatgacattt aatggatcct gcagtagtgt
5641 ttgcacatgg aagtccaaaa acctgaaagg aatatttcag ttcagagtag tagctgcaaa
5701 taatctaggg tttggtgaat atagtggaat cagtgagaat attatattag ttggagatga
5761 tttttggata ccagaaacaa gtttcatact tactattata gttggaatat ttctggttgt
5821 tacaatccca ctgacctttg TCTGGCATAG AAGATTAAAG AATCAAAAAA GTGCCAAGGA
5881 AGGGGTGACA GTGCTTATAA ACGAAGACAA AGAGTTGGCT GAGCTGCGAG GTCTGGCAGC
5941 CGGAGTAGGC CTGGCTAATG CCTGCTATGC AATACATACT CTTCCAACCC AAGAGGAGAT
6001 TGAAAATCTT CCTGCCTTCC CTCGGGAAAA ACTGACTCTG CGTCTCTTGC TGGGAAGTGG
6061 AGCCTTTGGA GAAGTGTATG AAGGAACAGC AGTGGACATC TTAGGAGTTG GAAGTGGAGA
6121 AATCAAAGTA GCAGTGAAGA CTTTGAAGAA GGGTTCCACA GACCAGGAGA AGATTGAATT
6181 CCTGAAGGAG GCACATCTGA TGAGCAAATT TAATCATCCC AACATTCTGA AGCAGCTTGG
6241 AGTTTGTCTG CTGAATGAAC CCCAATACAT TATCCTGGAA CTGATGGAGG GAGGAGACCT
6301 TCTTACTTAT TTGCGTAAAG CCCGGATGGC AACGTTTTAT GGTCCTTTAC TCACCTTGGT
6361 TGACCTTGTA GACCTGTGTG TAGATTATTC AAAAGCCTGT CTCTACTTGG AACGGATGCA
6421 TTTCATTCAC AGGGATCTGG CAGCTAGAAA TTGCCTTCTT TCCGTGAAAG ACTATACCAG
6481 TCCACGGATA GTGAAGATTG GAGACTTTGG ACTCGCCAGA GACATCTATA AAAATGATTA
6541 CTATAGAAAG AGAGGGGAAG GCCTGCTCCC AGTTCGGTGG ATGGCTCCAG AAAGTTTGAT
6601 GGATGGAATC TTCACTACTC AATCTGATGT ATGGTCTTTT GGAATTCTGA TTTGGGAGAT
6661 TTTAACTCTT GGTCATCAGC CTTATCCAGC TCATTCCAAC CTTGATGTGT TAAACTATGT
6721 GCAAACAGGA GGGAGACTGG AGCCACCAAG AAATTGTCCT GATGATCTGT GGAATTTAAT
6781 GACCCAGTGC TGGGCTCAAG AACCCGACCA AAGACCTACT TTTCATAGAA TTCAGGACCA
6841 ACTTCAGTTA TTCAGAAATT TTTTCTTAAA TAGCATTTAT AAGTCCAGAG ATGAAGCAAA
6901 CAACAGTGGA GTCATAAATG AAAGCTTTGA AGGTGAAGAT GGCGATGTGA TTTGTTTGAA
6961 TTCAGATGAC ATTATGCCAG TTGCTTTAAT GGAAACGAAG AACCGAGAAG GGTTAAACTA
7021 TATGGTACTT GCTACAGAAT GTGGCCAAGG TGAAGAAAAG TCTGAGGGTC CTCTAGGCTC
7081 CCAGGAATCT GAATCTTGTG GTCTGAGGAA AGAAGAGAAG GAACCACATG CAGACAAAGA
7141 TTTCTGCCAA GAAAAACAAG TGGCTTACTG CCCTTCTGGC AAGCCTGAAG GCCTGAACTA
7201 TGCCTGTCTC ACTCACAGTG GATATGGAGA TGGGTCTGAT TAATAGCGTT GTTTGGGAAA
7261 TAGAGAGTTG AGATAAACAC TCTCATTCAG TAGTTACTGA AAGAAAACTC TGCTAGAATG
7321 ATAAATGTCA TGGTGGTCTA TAACTCCAAA TAAACAATGC AACGTTCC
```

【図７】



【図８】



【図９－１】

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALYT
GFSILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKPPKPVS
KMRMATPLLMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEDHVMHLLQNADPLKVYP
PLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQKPTDAPPK
DDFWIPETSFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAEL
RGLAAGVGLANACYAIHTLPTQEEIENLPAFPREK**LTLRLLLGSGAFGEVYEGT**
AVDILGVGSGEIKVAVKTLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCL
LNEPQYIILELMEGGDLLTYLRKARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLE
RMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKIGDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPV
RWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQPYPAHSNLDVLNYVQTGG
RLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRIQDQLQLFRNFFLNSIYKSR
DEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVALMETKNREGLNYMVLATECGQ
GEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYA
CLTHSGYGDGSD

ATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAGAAGCCAGTCAT
GGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACTGCCCATGCTGGG
CCGGCGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCGGAGCCCTGTAC
ACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGCCAGGCCACCACC
GCCTACTTCCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAAACTGACAGTCAC
CTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGCTTCCCAAGCCTCC
CAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTGCTGATGCAGGCGC
TGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAATGCCACCAAGTAT
GGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCCAGAATGCTGACCCC
CTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCGGAGAACCTGAGACA
CCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGTCTTTGAGAGCTGGAT
GCACCATTGGCTCCTGTTTGAAATGAGCAGGCACTCCTTGGAGCAAAAGCC
CACTGACGCTCCACCGAAAGATGATTTTTGGATACCAGAAACAAGTTTCATA
CTTACTATTATAGTTGGAATATTTCTGGTTGTTACAATCCCACTGACCTTTGT
CTGGCATAGAAGATTAAAGAATCAAAAAAGTGCCAAGGAAGGGGTGACAGT
GCTTATAAACGAAGACAAAGAGTTGGCTGAGCTGCGAGGTCTGGCAGCCG
GAGTAGGCCTGGCTAATGCCTGCTATGCAATACATACTCTTCCAACCCAAGA
GGAGATTGAAAATCTTCCTGCCTTCCCTCGGGAAAAA**CTGACTCTGCGTCT**
CTTGCTGGGAAGTGGAGCCTTTGGAGAAGTGTATGAAGGAACAGCAGTG
GACATCTTAGGAGTTGGAAGTGGAGAAATCAAAGTAGCAGTGAAGACTTT
GAAGAAGGGTTCCACAGACCAGGAGAAGATTGAATTCCTGAAGGAGGCA
CATCTGATGAGCAAATTTAATCATCCCAACATTCTGAAGCAGCTTGGAGTT
TGTCTGCTGAATGAACCCCAATACATTATCCTGGAACTGATGGAGGGAGG
AGACCTTCTTACTTATTTGCGTAAAGCCCGGATGGCAACGTTTTATGGTCC
TTTACTCACCTTGGTTGACCTTGTAGACCTGTGTGTAGATATTTCAAAAGG

【図９－２】

(続き)

CTGTGTCTACTTGGAACGGATGCATTTCATTCACAGGGATCTGGCAGCTAG
AAATTGCCTTGTTTCCGTGAAAGACTATACCAGTCCACGGATAGTGAAGAT
TGGAGACTTTGGACTCGCCAGAGACATCTATAAAAATGATTACTATAGAAA
GAGAGGGGAAGGCCTGCTCCCAGTTCGGTGGATGGCTCCAGAAAGTTTG
ATGGATGGAATCTTCACTACTCAATCTGATGTATGGTCTTTTGGAATTCTGA
TTTGGGAGATTTTAACTCTTGGTCATCAGCCTTATCCAGCTCATTCCAACCT
TGATGTGTTAAACTATGTGCAAACAGGAGGGAGACTGGAGCCACCAAGAA
ATTGTCCTGATGATCTGTGGAATTTAATGACCCAGTGCTGGGCTCAAGAAC
CCGACCAAAGACCTACTTTTCATAGAATTCAGGACCAACTTCAGTTATTCA
GAAATTTTTTCTTAAATAGCATTTATAAGTCCAGAGATGAAGCAAACAACAGT
GGAGTCATAAATGAAAGCTTTGAAGGTGAAGATGGCGATGTGATTTGTTTGA
ATTCAGATGACATTATGCCAGTTGCTTTAATGGAAACGAAGAACCGAGAAGG
GTTAAACTATATGGTACTTGCTACAGAATGTGGCCAAGGTGAAGAAAAGTCT
GAGGGTCCTCTAGGCTCCCAGGAATCTGAATCTTGTGGTCTGAGGAAAGAA
GAGAAGGAACCACATGCAGACAAAGATTCTGCCAAGAAAAACAAGTGGCT
TACTGCCCTTCTGGCAAGCCTGAAGGCCTGAACTATGCCTGTCTCACTCAC
AGTGGATATGGAGATGGGTCTGATTAA

【図１０】

MHRRRSRSCREDQKPVMDDQRDLISNNEQLPMLGRRPGAPESKCSRGALY
TGFSILVTLLLAGQATTAYFLYQQQGRLDKLTVTSQNLQLENLRMKLPKP
PKPVSKMRMATPLLMQALPMGALPQGPMQNATKYGNMTEDHVMHLLQNAD
PLKVYPPLKGSFPENLRHLKNTMETIDWKVFESWMHHWLLFEMSRHSLEQ
KPTDAPPKVLTKCQEEVSHIPAVHPGSFRPKCDENGNYLPLQCYGSIGYC
WCVFPNGTEVPNTRSRGHHNCSESLELEDPSSGLGVTKQDLGPAPL

CAGGGTCCCAGATGCACAGGAGGAGAAGCAGGAGCTGTCGGGAAGATCAG
AAGCCAGTCATGGATGACCAGCGCGACCTTATCTCCAACAATGAGCAACT
GCCCATGCTGGGCCGGCGCCCTGGGGCCCCGGAGAGCAAGTGCAGCCGCG
GAGCCCTGTACACAGGCTTTTCCATCCTGGTGACTCTGCTCCTCGCTGGC
CAGGCCACCACCGCCTACTTCCTGTACCAGCAGCAGGGCCGGCTGGACAA
ACTGACAGTCACCTCCCAGAACCTGCAGCTGGAGAACCTGCGCATGAAGC
TTCCCAAGCCTCCCAAGCCTGTGAGCAAGATGCGCATGGCCACCCCGCTG
CTGATGCAGGCGCTGCCCATGGGAGCCCTGCCCCAGGGGCCCATGCAGAA
TGCCACCAAGTATGGCAACATGACAGAGGACCATGTGATGCACCTGCTCC
AGAATGCTGACCCCCTGAAGGTGTACCCGCCACTGAAGGGGAGCTTCCCG
GAGAACCTGAGACACCTTAAGAACACCATGGAGACCATAGACTGGAAGGT
CTTTGAGAGCTGGATGCACCATTGGCTCCTGTTTGAAATGAGCAGGCACT
CCTTGGAGCAAAAGCCCACTGACGCTCCACCGAAAGTACTGACCAAGTGC
CAGGAAGAGGTCAGCCACATCCCTGCTGTCCACCCGGGTTCATTCAGGCC
CAAGTGCGACGAGAACGGCAACTATCTGCCACTCCAGTGCTATGGGAGCA
TCGGCTACTGCTGGTGTGTCTTCCCCAACGGCACGGAGGTCCCCAACACC
AGAAGCCGCGGGCACCATAACTGCAGTGAGTCACTGGAACTGGAGGACCC
GTCTTCTGGGCTGGGTGTGACCAAGCAGGATCTGGGCCCAGCTCCTTTG

【図１１Ａ】

11A

MKNIYCLIPKLVNFATLGCLWISVVQCTVLNSCLKSCVTNLGQQLDLGTPHNLSEPCIQG
CHFWNSVDQKNCALKCRESCEVGCSSAEGAYEEEVLENADLPTAPFASSIGSHNMTLRWK
SANFSGVKYIIQWKYAQLLGSWTYTKTVSRPSYVVKPLHPFTEYIFRVVWIFTAQLQLYS
PPSPSYRTHPHGVPETAPLIRNIESSSPDTVEVSWDPPQFPGGPILGYNLRLISKNQKLD
AGTQRTSFQFYSTLPNTIYRFSIAAVNEVGEGPEAESSITTSSSAVQQEEQWLFLSRKTS
LRKRSLKHLVDEAHCLRLDAIYHNITGISVDVHQQIVYFSEGTLIWAKKAANMSDVSDLR
IFYRGSGLISSISIDWLYQRMYFIMDELVCVCDLENCSNIEEITPPSISAPQKIVADSYN
GYVFYLLRDGIYRADLPVPSGRCAEAVRIVESCTLKDFAIKPQAKRIIYFNDTAQVFMST
FLDGSASHLILPRIPFADVKSFACENNDFLVTDGKVIFQQDALSFNEFIVGCDLSHIEEF
GFGNLVIFGSSSQLHPLPGRPQELSVLFGSHQALVQWKPPALAIGANVILISDIIELFEL
GPSAWQNWTYEVKVSTQDPPEVTHIFLNISGTMLNVPELQSAMKYKVSVRASSPKRPGPW
SEPSVGTTLVPASEPPFIMAVKEDGLWSKPLNSFGPGEFLSSDIGNVSDMDWYNNSLYYS
DTKGDVFVWLLNGTDISENYHLPSIAGAGALAFEWLGHFLYWAGKTYVIQRQSVLTGHTD
IVTHVKLLVNDMVVDSVGGYLYWTTLYSVESTRLNGESSLVLQTQPWFSGKKVIALTLDL
SDGLLYWLVQDSQCIHLYTAVLRGQSTGDTTITEFAAWSTSEISQNALMYYSGRLFWING
FRIITTQEIGQKTSVSVLEPARFNQFTIIQTSLKPLPGNFSFTPKVIPDSVQESSFRIEG
NASSFQILWNGPPAVDWGVVFYSVEFSAHSKFLASEQHSLPVFTVEGLEPYALFNLSVTP
YTYWGKGPKTSLSLRAPETVPSAPENPRIFILPSGKCCNKNEVVVEFRWNKPKHENGVLT
KFEIFYNISNQSITNKTCEDWIAVNVTPSVMSFQLEGMSPRCFIAFQVRAFTSKGPGPYA
DVVKSTTSEINPFPHLITLLGNKIVFLDMDQNQVVWTFSAERVISAVCYTADNEMGYYAE
GDSLFLLHLHNRSSSELFQDSLVFDITVITIDWISRHLYFALKESQNGMQVFDVDLEHKV
KYPREVKIHNRNSTIISFSVYPLLSRLYWTEVSNFGYQMFYYSIISHTLHRILQPTATNQ
QNKRNQCSCNVTEFELSGAMAIDTSNLEKPLIYFAKAQEIWAMDLEGCQCWRVITVPAML
AGKTLVSLTVDGDLIYWIITAKDSTQIYQAKKGNGAIVSQVKALRSRHILAYSSVMQPFP
DKAFLSLASDTVEPTILNATNTSLTIRLPLAKTNLTWYGITSPTPTYLVYYAEVNDRKNS
SDLKYRILEFQDSIALIEDLQPFSTYMIQIAVKNVYSSDPLEHLPPGKEIWGKTKNGVPEA
VQLINTTVRSDTSLIISWRESHKPNGPKESVRYQLAISHLALIPETPLRQSEFPNGRLTL
LVTRLSGGNIYVLKVLACHSEEMWCTESHPVTVEMFNTPEKPYSLVPENTSLQFNWKAPL
NVNLIRFWVELQKWKYNEFYHVKTSCSQGPAYVCNITNLQPYTSYNVRVVVVYKTGENST
SLPESFKTKAGVPNKPGIPKLLEGSKNSIQWEKAEDNGCRITYYILEIRKSTSNNLQNQN
LRWKMTFNGSCSSVCTWKSKNLKGIFQFRVVAANNLGFGEYSGISENIILVGDDFWIPET
SFILTIIVGIFLVVTIPLTFVWHRRLKNQKSAKEGVTVLINEDKELAELRGLAAGVGLAN
ACYAITLPTQEEIENLPAFPREKLTLRLLLGSCAFGEVYEGTAVDILGVGSGEIKVAVK
TLKKGSTDQEKIEFLKEAHLMSKFNHPNILKQLGVCLLNEPQYIILELMEGGDLLTYLRK
ARMATFYGPLLTLVDLVDLCVDISKGCVYLERMHFIHRDLAARNCLVSVKDYTSPRIVKI
GDFGLARDIYKNDYYRKRGEGLLPVRWMAPESLMDGIFTTQSDVWSFGILIWEILTLGHQ
PYPAHSNLDVLNYVQTGGRLEPPRNCPDDLWNLMTQCWAQEPDQRPTFHRINQNLQLFRN
FFLNSIYQCRDEANNSGVINESFEGEDGDVICLNSDDIMPVVLMETKNREGLNYMVLATE
CGQGEEKSEGPLGSQESESCGLRKEEKEPHADKDFCQEKQVAYCPSGKPEGLNYACLTHS
GYGDGSD

【図１１Ｂ－１】

11B

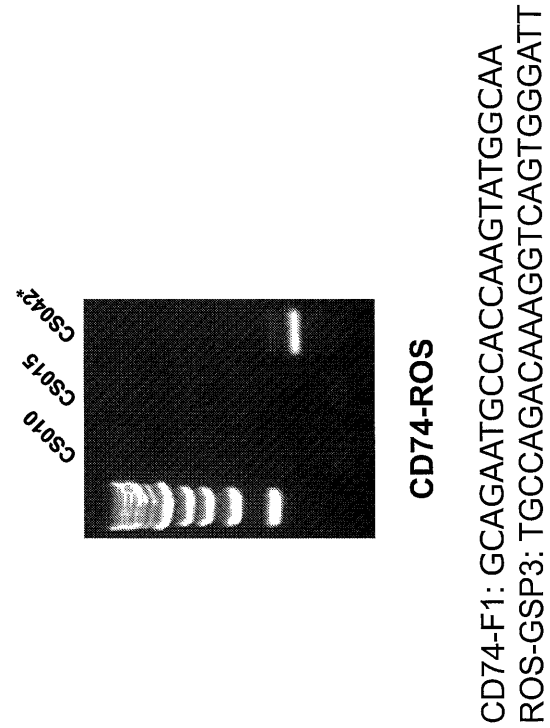
```
   1 caagctttca agcattcaaa ggtctaaatg aaaaaggcta agtattattt caaaaggcaa
  61 gtatatccta atatagcaaa acaaacaaag caaaatccat cagctactcc tccaattgaa
 121 gtgatgaagc ccaaataatt catatagcaa aatggagaaa attagaccgg ccatctaaaa
 181 atctgccatt ggtgaagtga tgaagaacat ttactgtctt attccgaagc ttgtcaattt
 241 tgcaactctt ggctgcctat ggatttctgt ggtgcagtgt acagttttaa atagctgcct
 301 aaagtcgtgt gtaactaatc tgggccagca gcttgacctt ggcacaccac ataatctgag
 361 tgaaccgtgt atccaaggat gtcacttttg gaactctgta gatcagaaaa actgtgcttt
 421 aaagtgtcgg gagtcgtgtg aggttggctg tagcagcgcg gaaggtgcat atgaagagga
 481 agtactggaa aatgcagacc taccaactgc tccctttgct tcttccattg gaagccacaa
 541 tatgacatta cgatggaaat ctgcaaactt ctctggagta aaatacatca ttcagtggaa
 601 atatgcacaa cttctgggaa gctggactta tactaagact gtgtccagac cgtcctatgt
 661 ggtcaagccc ctgcaccccct tcactgagta cattttccga gtggtttgga tcttcacagc
 721 gcagctgcag ctctactccc ctccaagtcc cagttacagg actcatcctc atggagttcc
 781 tgaaactgca cctttgatta ggaatattga gagctcaagt cccgacactg tggaagtcag
 841 ctgggatcca cctcaattcc caggtggacc tattttgggt tataacttaa ggctgatcag
 901 caaaaatcaa aaattagatg cagggacaca gagaaccagt ttccagtttt actccacttt
 961 accaaatact atctacaggt tttctattgc agcagtaaat gaagttggtg agggtccaga
1021 agcagaatct agtattacca cttcatcttc agcagttcaa caagaggaac agtggctctt
1081 tttatccaga aaaacttctc taagaaagag atctttaaaa catttagtag atgaagcaca
1141 ttgcctcggg ttggatgcta tatacctaaa tattacagga atatctgttg atgtccacca
1201 gcaaattgtt tatttctctg aaggaactct catatgggcg aagaaggctg ccaacatgtc
1261 tgatgtatct gacctgagaa ttttttacag aggttcagga ttaatttctt ctatctccat
1321 agattggctt tatcaaagaa tgtatttcat catggatgaa ctggtatgtg tctgtgattt
1381 agagaaccgc tcaaacatcg aggaaattac tccacccctct attagtgcac ctcaaaaaat
1441 tgtggctgat tcatacaatg ggtatgtctt ttacctcctg agagatggca tttatagagc
1501 agaccttcct gtaccatctg gccggtgtgc agaagctgtg cgtattgtgg agagttgcac
1561 gttaaaggac tttgcaatca agccacaagc caagcgaatc atttacttca atgacactgc
1621 ccaagtcttc atgtcaacat ttctggatgg ctctgcttcc catctcatcc tacctcgcat
1681 ccccttttgct gatgtgaaaa gttttgcttg tgaaaacaat gacttttctg tcacagatgg
1741 caaggtcatt ttccaacagg atgctttgtc ttttaatgaa ttcatcgtgg gatgtgacct
1801 gagtcacata gaagaatttg ggtttggtaa cttggtcatc tttggctcat cctcccagct
1861 gcacccctctg ccaggcgccc cgcaggagct ttcggtgctg tttggctctc accaggctct
1921 tgttcaatgg aagcctcctg cccttgccat aggagccaat gtcatcctga tcagtgatat
1981 tattgaactc tttgaattag gcccttctgc ctgcagaaac tggacctatg aggtgaaagt
2041 atccacccaa gaccctcctg aagtcactca tatttttctg aacataagtg gaaccatgct
2101 gaatgtacct gagctgcaga gtgctatgaa atacaaggtt tctgtgagag caagttctcc
2161 aaagaggcca ggcccctggt cagagccctc agtgggtact acccctggtgc cagctagtga
2221 accaccattt atcatggctg tgaaagaaga tggtgctttgg agtaaaccat taaatagctt
2281 tggcccagga gagttcttat cctctgatat aggaaatgtg tcagacatgg attggtataa
2341 caacagcctc tactacagtg acacgaaagg cgacgttttt gtgtggctgc tgaatgggac
2401 ggatatctca gagaattatc acctacccag cattgcagga gcagggggctt tagcttttga
2461 gtggctgggt cactttctct actgggctgg aaagacatat gtgatacaaa ggcagtctgt
2521 gttgacggga cacacagaca ttgttaccca cgtgaagcta ttggtgaatg acatggtggt
2581 ggattcagtt ggtggatatc tctactggac cactactctat tcagtggaaa gcaccagact
2641 aaatggggaa agttcccttg tactacagac acagccttgg ttttctggga aaaaggtaat
2701 tgctctaact ttagacctca gtgatgggct cctgtattgg ttggttcaag acagtcaatg
2761 tattcacctg tacacagctg ttcttcgggg acagagcact ggggatacca ccatcacaga
2821 atttgcagcc tggagtactt ctgaaatttc ccagaatgca ctgatgtact atagtggtcg
2881 gctgttctgg atcaatggct ttaggattat cacaactcaa gaaataggtc agaaaaccag
2941 tgtctctgtt ttggaaccag ccagatttaa tcagttcaca attattcaga catcccttaa
3001 gccgctgcca gggaactttt cctttacccc taaggttatt ccagattctg ttcaagagtc
3061 ttcatttagg attgaaggaa atgcttcaag ttttcaaatc ctgtggaatg gtcccctgc
3121 ggtagactgg ggtgtagttt tctacagtgt agaattttagt gctcattcta agttctttgc
3181 tagtgaacaa cactctttac ctgtatttac tgtggaagga ctggaacctt atgcctcatt
3241 taatctttct gtcactcctt atacctactg gggaaggcgc acccaaacat ctctgtcact
3301 tcgagcacct gaaacagttc catcagcacc agagaacccc agaatattta tattaccaag
3361 tggaaaatgc tgcaacaaga atgaagttgt ggtggaattt aggtggaaca aacctaagca
3421 tgaaaatggg gtgttaacaa aatttgaaat tttctacaat atatccaatc aaagtattac
3481 aaacaaaaca tgtgaagact ggattgctgt caatgtcact ccctcagtga tgtcttttca
3541 acttgaaggc atgagtccca gatgctttat tgcctttccag gttaggggct ttacatctaa
3601 ggggccagga ccatatgctg acgttgtaaa gtctacaaca tcagaaatca acccatttcc
```

【図１１Ｂ－２】

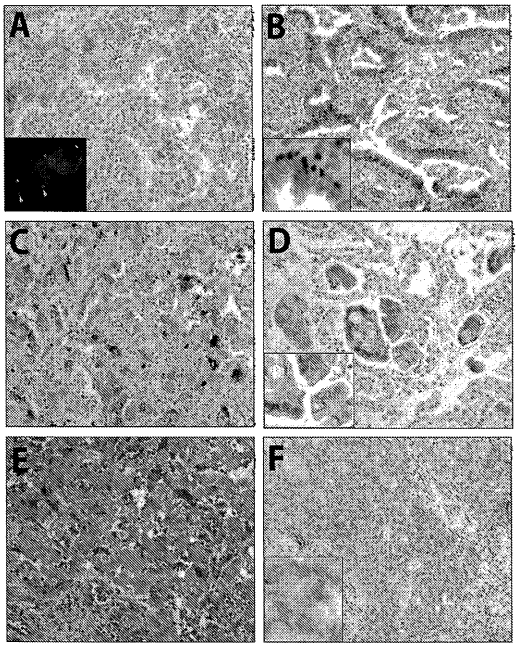
11B (続き)

```
3661 tcacctcata actcttcttg gtaacaagat agttttttta gatatggatc aaaatcaagt
3721 tgtgtggacg ttttcagcag aaagagttat cagtgccgtt tgctacacag ctgataatga
3781 gatgggatat tatgctgaag gggactcact ctttcttctg cacttgcaca atcgctctag
3841 ctctgagctt ttccaagatt cactggtttt tgatatcaca gttattacaa ttgactggat
3901 ttcaaggcac ctctactttg cactgaaaga atcacaaaat ggaatgcaag tatttgatgt
3961 tgatcttgaa cacaaggtga aatatcccag agaggtgaag attcacaata ggaattcaac
4021 aataatttct tttttctgtat atcctctttt aagtcgcttg tattggacag aagtttccaa
4081 ttttggctac cagatgttct actacagtat tatcagtcac accttgcacc gaattctgca
4141 acccacagct acaaaccaac aaaacaaaag gaatcaatgt tcttgtaatg tgactgaatt
4201 tgagttaagt ggagcaatgg ctattgatac ctctaaccta gagaaaccat tgatatactt
4261 tgccaaagca caagagatct gggcaatgga tctggaaggc tgtcagtgtt ggagagttat
4321 cacagtacct gctatgctcg caggaaaaac ccttgttagc ttaactgtgg atggagatct
4381 tatatactgg atcatcacag caaaggacag cacacagatt tatcaggcaa agaaaggaaa
4441 tggggccatc gtttcccagg tgaaggccct aaggagtagg catatcttgg cttacagttc
4501 agttatgcag ccttttccag ataaagcgtt tctgtctcta gcttcagaca ctgtggaacc
4561 aactatactt aatgccacta acactagcct cacaatcaga ttacctctgg ccaagacaaa
4621 cctcacatgg tatggcatca ccagccctac tccaacatac ctggtttatt atgcagaagt
4681 taatgacagg aaaaacagct ctgacttgaa atatagaatt ctggaatttc aggacagtat
4741 agctcttatt gaagatttac aaccattttc aacatacatg atacagatag ctgtaaaaaa
4801 ttattattca gatcctttgg aacatttacc accaggaaaa gagatttggg gaaaaactaa
4861 aaatggagta ccagaggcag tgcagctcat taatacaact gtgcggtcag acaccagcct
4921 cattatatct tggagagaat ctcacaagcc aaatggacct aaagaatcag tccgttatca
4981 gttggcaatc tcacacctgg ccctaattcc tgaaactcct ctaagacaaa gtgaatttcc
5041 aaatggaagg ctcactctcc ttgttactag actgtctggt ggaaatattt atgtgttaaa
5101 ggttcttgcc tgccactctg aggaaatgtg gtgtacagag agtcatcctg tcactgtgga
5161 aatgtttaac acaccagaga aaccttattc cttggttcca gagaacacta gtttgcaatt
5221 taattggaag gctccattga atgttaacct catcagattt tgggttgagc tacagaagtg
5281 gaaatacaat gagttttacc atgttaaaac ttcatgcagc caaggtcctg cttatgtctg
5341 taatatcaca aatctacaac cttatacttc atataatgtc agagtagtgg tggtttataa
5401 gacgggagaa aatagcacct cacttccaga aagctttaag acaaaagctg gagtcccaaa
5461 taaaccaggc attcccaaat tactagaagg gagtaaaaat tcaatacagt gggagaaagc
5521 tgaagataat ggatgtagaa ttatacatca tatccttgag ataagaaaga gcacttcaaa
5581 taatttacag aaccagaatt taaggtggaa gatgacattt aatggatcct gcagtagtgt
5641 ttgcacatgg aagtccaaaa acctgaaagg aatatttcag ttcagagtag tagctgcaaa
5701 taatctaggg tttggtgaat atagtggaat cagtgagaat attatattag ttggagatga
5761 tttttggata ccagaaacaa gtttcatact tactattata gttggaatat ttctggttgt
5821 tacaatccca ctgacctttg tctggcatag aagattaaag aatcaaaaaa gtgccaaggg
5881 aggggtgaca gtgcttataa acgaagacaa agagttggct gagctgcgag gtctggcagc
5941 cggagtaggc ctggctaatg cctgctatgc aatacatact cttccaaccc aagaggagat
6001 tgaaaatctt cctgcctttcc ctcgggaaaa actgactctg cgtctcttgc tgggaagtgg
6061 agccttgga gaagtgtatg aaggaacagc agtggacatc ttaggagttg gaagtggaga
6121 aatcaaagta gcagtgaaga ctttgaagaa gggttccaca gaccaggaga agattgaatt
6181 cctgaaggag gcacatctga tgagcaaatt taatcatccc aacattctga agcagctttg
6241 agtttgtctg ctgaatgaac cccaatacat tatcctggaa ctgatggagg gaggagacct
6301 tcttacttat ttgcgtaaag cccggatggc aacgttttat ggtccttac tcaccttggt
6361 tgaccttgta gacctgtgtg tagatatttc aaaaggctgt gtctacttgg aacggatgca
6421 tttcattcac agggatctgg cagctagaaa ttgcctgtt tccgtgaaag acatctaccag
6481 tccacggata gtgaagattg gagactttgg actcgccaga gacatctata aaaatgatta
6541 ctatagaaag agaggggaag gcctgctccc agttcggtgg atggctccag aaagtttgat
6601 ggatggaatc ttcactactc aatctgatgt atggtctttt ggaattctga tttgggagat
6661 tttaactctt ggtcatcagc cttatccagc tcattccaac cttgatgtgt taaactatgt
6721 gcaaacagga gggagactgg agccaccaag aaattgtcct gatgatctgt ggaatttaat
6781 gacccagtgc tgggctcaag aacccgacca aagacctact tttcatagaa ttcaggacca
6841 acttcagtta ttcagaaatt ttttcttaaa tagcatttat aagtccagag atgaagcaaa
6901 caacagtgga gtcataaatg aaagctttga aggtgaagat ggcgatgtga tttgtttgaa
6961 ttcagatgac attatgccag ttgctttaat ggaaacgaag aaccgagaag ggttaaacta
7021 tatggtactt gctacagaat gtggccaagg tgaagaaaag tctgagggtc ctctaggctc
7081 ccaggaatct gaatcttgtg gtctgaggaa agaagagaag gaaccacatg cagacaaaga
7141 tttctgccaa gaaaaacaag tggcttactg ccctgctggc aagcctgaag gcctgaacta
7201 tgcctgtctc actcacagtg gatatggaga tgggtctgat taatagcgtt gtttgggaaa
7261 tagagagttg agatataacac tctcattcag tagttactga aagaaaactc tgctagaatg
7321 ataaatgtca tggtggtcta taactccaaa taaacaatgc aacgttcc
```

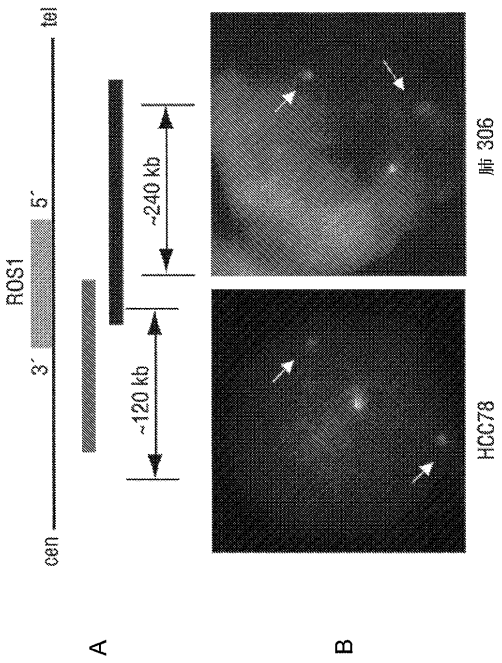
【図１２】



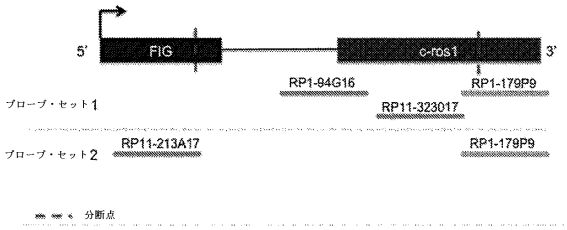
【図１３】



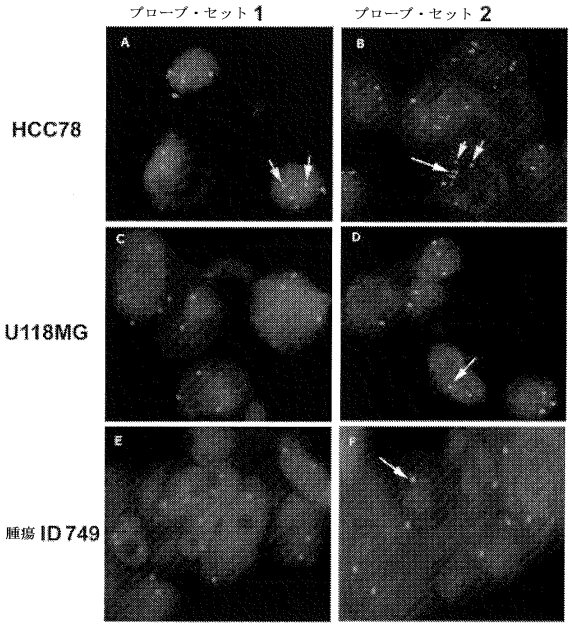
【図１４】



【図１５】



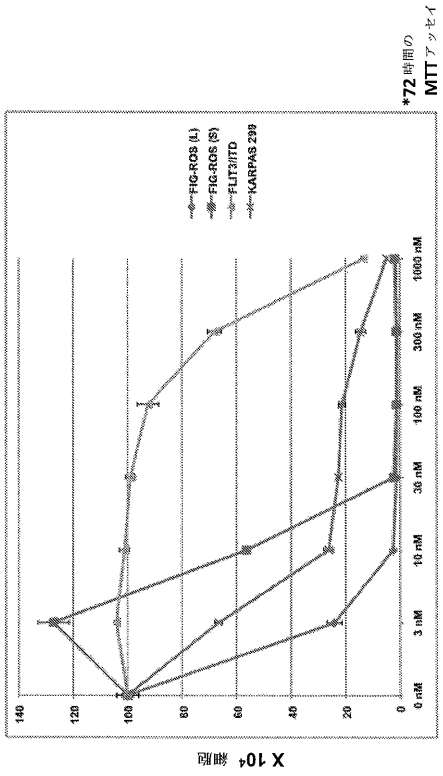
【図１６】



【図１７】

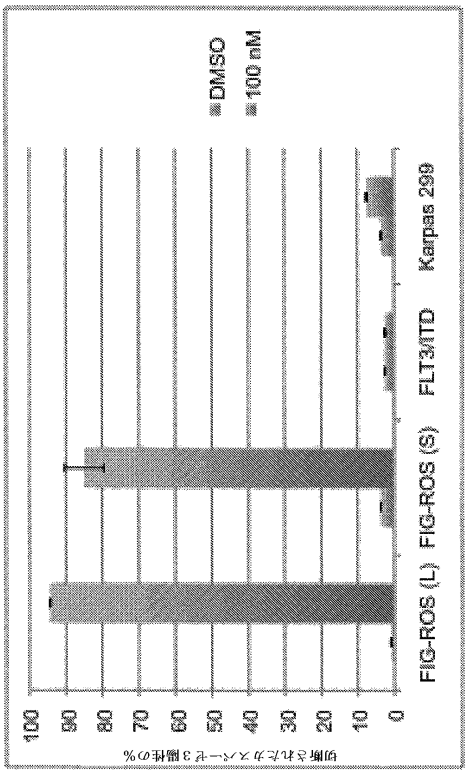
```
>lcl|9303
Length=167

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

Query  556  GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGGGCGCAGACTAGCTGCCAAGTACTTGGATAAGGAA  615
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  3    GCTGTTCTCCAGGCTGAAGTATATGGGCGCAGACTAGCTGCCAAGTACTTGGATAAGGAA  62

Query  616  CTGGCAGGAAAGTACTCTTCCAACCCAAGAGGAGATTGAAAATCTTCCTGCCTCCCTCGG  675
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  63   CTGGCAGGAAAGTACTCTTCCAACCCAAGAGGAGATTGAAAATCTTCCTGCCTCCCTCGG  122

Query  676  GAAAAACTGACTCTGCGTCTCTTGCTG  702
            |||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  123  GAAAAACTGACTCTGCGTCTCTTGCTG  149
```

【図１８】

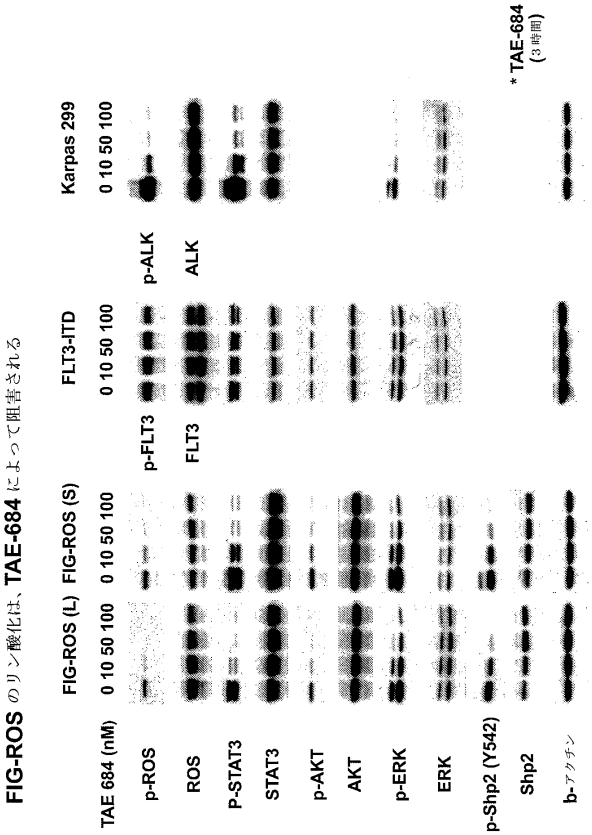


【図１９】

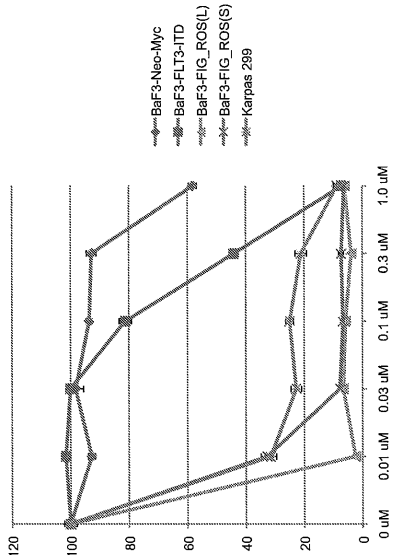
TAE-684 は、**FIG-ROS** 発現 **BaF3** 細胞において
アポトーシスを誘導する



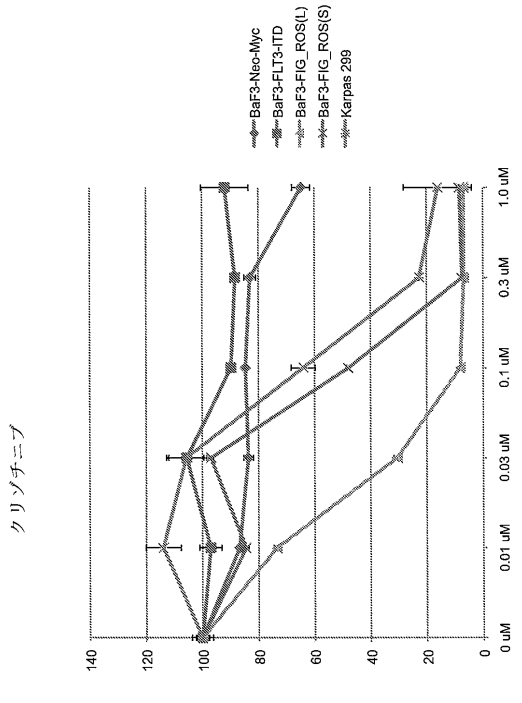
【図２０】



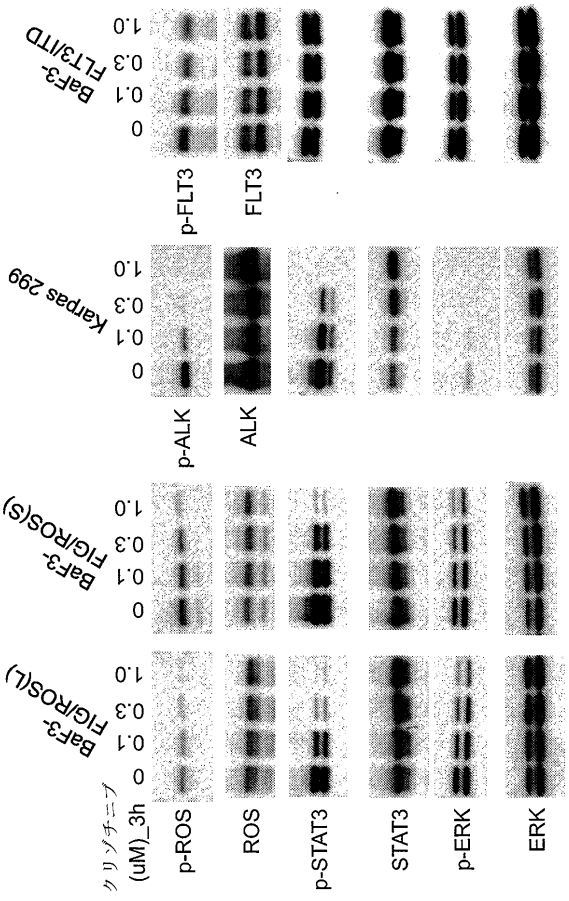
【図２１Ａ】



【図２１Ｂ】



【図２２】



【配列表】
0006619070000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
C12N 9/12	*(2006.01)*		G01N	33/543	597
C12N 15/62	*(2006.01)*		C07K	19/00	
C12N 15/54	*(2006.01)*		C12N	9/12	
			C12N	15/62	Z
			C12N	15/54	

(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０１９８２．サウスハミルトン．エコーコーブロード１３８
(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０１８０１．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０２４２１．レキシントン．スクールストリート８３
(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０１６０５．ウースター．ネプチューンロード３２
(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０１９４９．ミドルトン．カブラルドライブ３８
(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０１９７０．セーレム．ジャポニカストリート２５
(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０１９１５．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 特表２０１１－５０１６６９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１０／０９３９２８（WO，Ａ２）
国際公開第２００９／０５１８４６（WO，Ａ２）
ACQUAVIVA J, THE MULTIFACETED ROLES OF THE RECEPTOR TYROSINE KINASE ROS IN DEVELOPMENT AND CANCER, BBA - REVIEWS ON CANCER, NL, ELSEVIER SCIENCE BV, ２００９年 １月 １日, V1795 N1, P37-52

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）

专利名称(译)	肺癌中的罗斯激酶		
公开(公告)号	JP6619070B2	公开(公告)日	2019-12-11
申请号	JP2018169294	申请日	2018-09-11
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 ティンレイグ 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 ティン-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 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543 C07K19/00 C12N9/12 C12N15/62 C12N15/54		
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.ZNA.A G01N33/48.M G01N33/53.M G01N33/53.Y G01N33/543.545.A G01N33/543.597 C07K19/00 C12N9/12 C12N15/62.Z C12N15/54 G01N33/574.AZN.A		
F-TERM分类号	4B050/CC05 4B050/CC10 4B050/DD11 4B050/LL03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA41 4H045/DA89 4H045/EA51 4H045/EA54		
优先权	13/113676 2011-05-23 US		
其他公开文献	JP2019023645A5 JP2019023645A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了在哺乳动物肺癌中具有ROS激酶活性的多肽的存在的鉴定。 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）多肽的多核苷酸之间融合的结果。 描述了ROS的三种不同融合伴侣，即由FIG基因，SLC34A2基因和CD74基因编码的蛋白质。 本发明实现了用于确定生物样品中具有ROS激酶活性的多肽的存在的新方法，用于筛选抑制蛋白质的化合物的方法以及用于抑制癌症（例如肺癌）进展的方法。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6619070号
(P6619070)
(45)発行日　令和1年12月11日(2019.12.11)　(24)登録日　令和1年11月22日(2019.11.22)

(51)Int.Cl.			F I		
G01N	33/574	(2006.01)	G01N	33/574	ZNAA
G01N	33/48	(2006.01)	G01N	33/48	M
G01N	33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M
G01N	33/543	(2006.01)	G01N	33/53	Y
C07K	19/00	(2006.01)	G01N	33/543	545A

請求項の数 12　外国語出願　(全 79 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-169294 (P2018-169294)
(22)出願日　平成30年9月11日 (2018.9.11)
(62)分割の表示　特願2017-173626 (P2017-173626)の分割
原出願日　平成24年5月23日 (2012.5.23)
(65)公開番号　特開2019-23645 (P2019-23645A)
(43)公開日　平成31年2月14日 (2019.2.14)
審査請求日　平成30年9月11日 (2018.9.11)
(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・地域又は機関
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　01923　ダンヴァーズ　トラスク・レーン　3
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　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01867，リーディング，グローヴストリート57

最終頁に続く

(54)【発明の名称】肺癌におけるＲＯＳキナーゼ