

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-532111**(P2007-532111A)**(43) 公表日 **平成19年11月15日(2007.11.15)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 M	
GO1N 33/574 (2006.01)	GO1N 33/574 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2007-507418 (P2007-507418)	(71) 出願人	592130699
(86) (22) 出願日	平成17年4月6日 (2005.4.6)		ザ・レジエンツ・オブ・ザ・ユニバーシテ
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月21日 (2006.11.21)		ィ・オブ・カリフォルニア
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/011425		The Regents of The
(87) 国際公開番号	W02005/100605		University of Calif
(87) 国際公開日	平成17年10月27日 (2005.10.27)		ornia
(31) 優先権主張番号	60/559, 762		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 オー
(32) 優先日	平成16年4月6日 (2004.4.6)		クランド フランクリン ストリート 1
(33) 優先権主張国	米国 (US)		111 12ス フロア オフィス オブ
			テクノロジー トランスファー
		(74) 代理人	100102978
			弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048
			弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 乳癌における標的としてのオーファン受容体チロシンキナーゼ

(57) 【要約】

オーファン受容体チロシンキナーゼ (ROR1) に関する方法および材料を記載する。ROR1は正常成体組織では限定された組織発現を示し、ある種の乳癌サブタイプでは過剰発現される。ROR1は、乳癌に対する診断的および/または治療的な標的を提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチドをコードするオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチドの生物試料におけるレベルを評価する段階を含み、ここで被験試料におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが正常乳房組織試料と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られ；かつここで細胞におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物とハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験生物試料中のROR1ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価することによって評価される、方法。

10

【請求項 2】

ROR1相補的ポリヌクレオチドが検出マーカーで標識されている、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

ハイブリダイゼーション複合体の存在がノーザン分析によって評価される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

ROR1相補的ポリヌクレオチドが、ポリメラーゼ連鎖反応に用いるためのプライマーを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項 5】

ハイブリダイゼーション複合体の存在がポリメラーゼ連鎖反応によって評価される、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

被験試料において検査されるROR1ポリヌクレオチドがmRNAである、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

被験生物試料におけるHer-2(SEQ ID NO: 3)、EGFR(SEQ ID NO: 4)、VEGF(SEQ ID NO: 5)、FMS様チロシンキナーゼ(SEQ ID NO: 6)、MYC(SEQ ID NO: 7)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター(SEQ ID NO: 8)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(SEQ ID NO: 9)、BRCA1(SEQ ID NO: 10)またはBRCA2(SEQ ID NO: 11)ポリヌクレオチドの発現を検査する段階をさらに含む、請求項1記載の方法。

30

【請求項 8】

乳癌が基底状サブタイプ(basal subtype)のものである、請求項1記載の方法。

【請求項 9】

乳癌がBRCA1サブタイプのものである、請求項1記載の方法。

【請求項 10】

ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示された配列を有するオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリペプチドの生物試料におけるレベルを評価する段階を含み、ここで被験試料におけるROR1ポリペプチドのレベルが正常乳房組織試料と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られ；かつここで細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体と接触させること、および抗体と試料中のROR1ポリペプチドとの結合によって形成される複合体の存在を評価することによって評価される、方法。

40

【請求項 11】

複合体の存在が、ELISA分析、ウエスタン分析および免疫組織化学からなる群より選択される方法によって評価される、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体が検出マ-

50

カーで標識されている、請求項10記載の方法。

【請求項13】

被験生物試料におけるHer-2(SEQ ID NO: 3)、EGFR(SEQ ID NO: 4)、VEGF(SEQ ID NO: 5)、FMS様チロシンキナーゼ(SEQ ID NO: 6)、MYC(SEQ ID NO: 7)、ウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター(SEQ ID NO: 8)、プラスミノーゲンアクチベーターインヒビター(SEQ ID NO: 9)、BRCA1(SEQ ID NO: 10)またはBRCA2(SEQ ID NO: 11)mRNAの発現を検査する段階をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項14】

乳癌が基底状サブタイプのものである、請求項10記載の方法。

【請求項15】

乳癌がBRCA1サブタイプのものである、請求項10記載の方法。

10

【請求項16】

被験ヒト細胞をヒト癌の指標となる染色体異常の証拠に関して検査する方法であって、被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化を同定するために、正常細胞における第1番染色体のバンドp31からのオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチド配列を被験ヒト細胞における第1番染色体のバンドp31からのROR1ポリヌクレオチド配列と比較する段階であって、ここで被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化によってヒト癌の指標となる染色体異常の証拠が得られる段階を含み、

ここで被験ヒト細胞における第1番染色体、バンドp31が、被験ヒト細胞試料中のROR1ポリヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物と特異的にハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験ヒト細胞内のROR1ポリヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価することによって評価される、方法。

20

【請求項17】

ハイブリダイゼーション複合体の存在が、ノーザン分析、サザン分析またはポリメラーゼ連鎖反応分析によって評価される、請求項16記載の方法。

【請求項18】

癌が乳癌である、請求項16記載の方法。

30

【請求項19】

乳癌が基底状サブタイプのものである、請求項18記載の方法。

【請求項20】

乳癌がBRCA1サブタイプのものである、請求項18記載の方法。

【請求項21】

容器、該容器上のラベル、および該容器の内部に含まれる組成物を含むキットであって、

組成物が、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするROR1特異的抗体および/またはポリヌクレオチドを含み、該容器上のラベルが、組成物を少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用い得ること、ならびにROR1抗体および/またはポリヌクレオチドを少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用いるための指示を示している、キット。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本明細書に記載される本発明は、オーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)を発現する癌、特に乳癌の診断、治療および管理において有用な方法および組成物に関する。

【0002】

50

関連出願の相互参照

本出願は、特許法119条(e)の下に、2004年4月6日に提出された米国仮出願第60/559,762号(その内容は参照として本明細書に組み入れられる)の優先権を主張する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

癌は冠動脈疾患に次いで、ヒトの死亡の二番目に多い原因である。世界的には、毎年数百万人もの人々が癌のために死亡している。米国だけでも癌は年間50万人を優に超える人々の死亡の原因となっている。ほぼ140万例の症例が毎年新たに診断されている。心疾患による死亡は大きく減少しつつあるが、癌に起因するものは概ね増加中である。

10

【0004】

世界的に、いくつかの癌は主要な死因として突出している。特に、乳房、肺、前立腺、結腸、膵臓および卵巣の癌は、癌による死亡の主な原因となっている。これらの癌および他の事実上すべての癌は、共通の致死的な特徴がある。極めて少数の例外を除き、癌による転移性疾患は致死性である。さらに、原発性癌から当初は生き延びた癌患者であっても、一般的な経験からは、彼らの生活が劇的に変化し、多くの癌患者が再発することが示されている。

【0005】

乳房の癌は、女性の死亡の主要原因の一つであり、女性が乳癌を発症する累積生涯リスクは9分の1と推定されている。したがって、これらの悪性腫瘍の起源およびサブタイプの理解、ならびに新たな診断的および治療的な手段の同定のためのモデルは、医療専門家の大きな関心の対象である。乳癌のため死亡するほとんどの女性は、最初の原発性疾患(これは通常、さまざまな治療法に反応しやすい)のせいで死亡するのではなく、乳癌の遠隔部位への転移性波及のために死亡する。この事実は、さらなる診断方法、ならびに乳房腫瘍の諸サブタイプに特異的に向けられた新規な抗癌薬またはより攻撃的な形態の治療法という両者の開発の必要性を強く示している。

20

【発明の開示】

【0006】

発明の概要

本発明は、乳房の癌を含む癌において異常に発現される、オーファン受容体チロシンキナーゼROR1と命名された遺伝子に関する。ROR1を過剰発現する乳癌腫瘍は予後不良と関連付けられており、ROR1群における予後不良腫瘍のパーセンテージ(散発例の70%)は、Her-2、上皮増殖因子受容体(EGFR)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、Fms様チロシンキナーゼ-3(F1t3)、C-MYC、ウロキナーゼプラスミノージェンアクチベーター(uPA)およびプラスミノージェンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)を含む、分析された他のあらゆる単一の予後遺伝子よりも高い。さらに、乳房の癌は数多くの異なるサブタイプにグループ分けすることができ、ROR1は基底状(basal)サブタイプおよびBRCA1サブタイプにおいて特異的にアップレギュレートされる。正常成体組織におけるROR1の発現プロファイルを、種々の乳癌サブタイプで観察される異常な発現と総合して考えると、ROR1はこのような癌に対する有用な診断標的として役立つ可能性がある。

30

40

【0007】

本発明は、ROR1タンパク質およびその断片をコードするポリヌクレオチド、ROR1遺伝子またはmRNA配列もしくはそれらの部分に対して相補的なDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッドおよび関連分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびにROR1遺伝子、mRNAまたはROR1をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む、好ましくは単離された形態にある、ROR1遺伝子、mRNAおよび/またはコード配列の全体または部分に対応する、または相補的なポリヌクレオチドを提供する。ROR1をコードするcDNAおよび遺伝子を単離するための手段も同じく提供される。ROR1ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子、このような分子による形質転換または形質導入を受けた細胞、およびROR1遺伝子の発現のための宿主-ベクター系も提供される。

50

本発明はさらに、ROR1タンパク質およびそのポリペプチド断片を提供する。本発明はさらに、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、マウスおよび他の哺乳動物抗体、キメラ抗体、ヒト化および完全ヒト抗体、ならびに検出マーカーで標識した抗体、および放射性核種、毒素または他の治療的組成物が結合した抗体を含む、ROR1タンパク質およびそのポリペプチド断片と結合する抗体を提供する。

【0008】

本発明はさらに、さまざまな生物試料(例えば、乳癌生検試料)におけるROR1ポリヌクレオチドおよびタンパク質の存在および状態を検出するための方法、ならびにROR1を発現する細胞を同定するための方法を提供する。本発明の1つの典型的な態様は、さまざまな乳癌、例えばSorlie et al., PNAS (2001), 98(19): 10869-10874(これは参照として本明細書に組み入れられる)に記載されたような基底状サブタイプおよびBRCA1サブタイプに認められるような、何らかの型の増殖調節障害を有するか有することが疑われる組織試料におけるROR1遺伝子産物をモニタリングするための方法を提供する。

10

【0009】

本発明の1つの例示的な態様は、SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチドをコードするオープン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチドの生物試料におけるレベルを評価することによって、ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、被験試料におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが正常乳房組織試料と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られ、細胞におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物とハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験生物試料中のROR1ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価することによって評価される方法である。本発明のいくつかの特定の態様において、乳癌は基底状サブタイプのものである。本発明のまた別の態様において、乳癌はBRCA1サブタイプのものである。

20

【0010】

1つの関連した態様は、SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチドをコードするオープン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチドのヒト乳房細胞におけるレベルを評価することによって、ヒト乳房細胞を乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリヌクレオチド(例えば、mRNAおよびゲノム配列)のレベルが正常ヒト乳房細胞と比較して高いことによって乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠が得られ、乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠が検査されるように、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが、ヒト乳房細胞内の内因性ROR1ポリヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチド(例えば、検出マーカーで標識されたプローブまたはPCRプライマー)と接触させ、ROR1相補的ポリヌクレオチドと試料中のROR1ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価すること(例えば、ノーザン分析またはPCRにより)によって評価される方法である。本発明のいくつかの特定の態様は、被験生物試料におけるHer-2(SEQ ID NO: 3)、EGFR(SEQ ID NO: 4)、VEGF(SEQ ID NO: 5)、FMS様チロシンキナーゼ(SEQ ID NO: 6)、MYC(SEQ ID NO: 7)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター(SEQ ID NO: 8)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(SEQ ID NO: 9)、BRCA1(SEQ ID NO: 10)またはBRCA2(SEQ ID NO: 11)ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの発現および/または配列を検査する段階をさらに含む。

30

40

【0011】

本発明のもう1つの態様は、ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示された配列を有するオープン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリペプチドの生物試料におけるレベルを評価する段階であって、被験試料におけるROR1ポリペプチドのレベルが正常乳房組織試料と比較

50

して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られる段階を含み、細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体と接触させること、および抗体と試料中のROR1ポリペプチドとの結合によって形成される複合体の存在を評価することによって評価される方法である。

【0012】

本発明の1つの関連した態様は、癌性であることが疑われるヒト乳房細胞(例えば、生検試料からの)を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示された配列を有するオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリペプチドの乳房細胞におけるレベルを評価する段階であって、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが正常乳房細胞(例えば、ヒト乳房細胞を得た個体からの正常細胞)と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られる段階を含み、細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体(例えば、検出マーカーで標識されたもの)と接触させること、および抗体と試料中のROR1ポリペプチドとの結合によって形成される複合体の存在を評価することによって評価される方法である。典型的には、複合体の存在は、ELISA分析、ウエスタン分析および免疫組織化学からなる群より選択される方法によって評価される。任意で、乳癌は基底状サブタイプまたはBRCA1サブタイプである。

10

【0013】

本発明のさらにもう1つの態様は、被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化を同定するために、正常細胞における第1番染色体のバンドp31からのオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチド配列を被験ヒト細胞における第1番染色体のバンドp31からのROR1ポリヌクレオチド配列と比較することにより、被験ヒト細胞をヒト癌の指標となる染色体異常の証拠に関して検査する方法であって、被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化によってヒト癌の指標となる染色体異常の証拠が得られる方法である。このような方法において、被験ヒト細胞における第1番染色体、バンドp31は、典型的には、被験ヒト細胞試料中のROR1ポリヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物と特異的にハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験ヒト細胞内のROR1ポリヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価すること(例えば、ノーザン分析、サザン分析またはポリメラーゼ連鎖反応分析により)によって評価される。

20

30

【0014】

本発明のもう1つの態様は、容器、前記容器上のラベル、および前記容器の内部に含まれる組成物を含むキットであって、組成物が、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする(またはSEQ ID NO: 1に示されたポリヌクレオチドによってコードされたROR1ポリペプチドに結合する)ROR1特異的抗体および/またはポリヌクレオチドを含む組成物を含み、前記容器上のラベルが、組成物を少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用い得ること、ならびにROR1抗体および/またはポリヌクレオチドを少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用いるための指示を示しているキットである。

40

【0015】

本発明はさらに、ROR1の機能を阻害することを目的とする抗体ベースの治療法を含む、ROR1を発現する乳癌などの癌を治療するためのさまざまな治療用組成物および戦略を提供する。

【0016】

発明の詳細な説明

別に定義する場合を除き、本明細書で用いるすべての技術用語、表記およびその他の科学用語は、本発明と関係する当業者によって一般に理解されている意味を有するものとす

50

る。場合によっては、明確さおよび/または参照の便宜を図るために、意味が一般的に理解されている用語の定義を本明細書で行っているが、このような定義を本明細書に含めたことは、当技術分野において一般に理解されているものと実質的に異なることを意味するとは必ずしもみなされるべきではない。本明細書に記載または言及された技法および手順は、当業者に一般によく理解されており、例えば、Ausubel et al, eds., 1995, 「Current Protocols in Molecular Biology」, Wiley and Sonsに記載された、広く利用されている分子クローニング法などの慣例的な方法を用いて一般に行われる。適宜、市販のキットおよび試薬を用いる手順が、別に特記する場合を除き、製造者が指示した手順および/またはパラメーターに従って一般に行われる。

【0017】

本明細書で用いる場合、「ポリヌクレオチド」という用語は、長さが少なくとも10塩基または塩基対である、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドまたは改変型のいずれかの種類のヌクレオチドで構成される重合型のヌクレオチドのことを意味し、これは一本鎖型および二本鎖型のDNAを含むものとする。

【0018】

本明細書で用いる場合、「ポリペプチド」という用語は、少なくとも6アミノ酸で構成される重合体のことを意味する。本明細書の全体を通じて、アミノ酸に関する標準的な三文字または一文字表記を用いる。

【0019】

本明細書で用いる「ハイブリダイズする (hybridize)」、「ハイブリダイズしている」、「ハイブリダイズする (hybridizes)」などの用語は、通常のハイブリダイゼーション条件、好ましくは、50%ホルムアミド/6×SSC/0.1%SDS/100 μg/ml ssDNA中でのハイブリダイゼーションでハイブリダイゼーション用の温度が37 °Cを上回り、0.1×SSC/0.1%SDS中での洗浄用の温度が55 °Cを上回るといったもの、最も好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件のことを意味する。

【0020】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジェンシー」は、当業者によって容易に決定可能であり、これは一般に、プローブの長さ、洗浄温度および塩濃度に依存する経験的な計算値である。一般に、より長いプローブは適切なアニーリングのためにより高い温度を必要とし、より短いプローブはより低い温度を必要とする。ハイブリダイゼーションは一般に、融解温度を下回る環境に相補鎖が存在する場合に変性DNAが再アニーリングする能力に依存する。プローブとハイブリダイズ性配列との間に求められる度合いの相溶性が高いほど、用い得る相対的な温度が高くなる。その結果として、相対的な温度が高いほど反応条件がよりストリンジェントとなり、より低い温度ではよりストリンジェントでなくなる傾向があると考えられる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーに関するそのほかの詳細および説明については、Ausubel et al., 「Current Protocols in Molecular Biology」, Wiley Interscience Publishers, (1995)を参照されたい。

【0021】

「ストリンジェントな条件」または「高ストリンジェンシー条件」は、本明細書における定義では、以下によって特定することができる：(1)洗浄のために低イオン強度および高温を用いる、例えば、50 °Cの0.015M塩化ナトリウム/0.0015Mクエン酸ナトリウム/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミドなどの変性剤を用いる、例えば、50% (v/v)ホルムアミドを0.1%ウシ血清アルブミン/0.1% Ficoll/0.1% ポリビニルピロリドン/750mM塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウムを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 6.5とともに42 °Cで用いる；または(3)50%ホルムアミド、5×SSC(0.75M NaCl、0.075Mクエン酸ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%ピロリン酸ナトリウム、5×デンハルト溶液、超音波サケ精子DNA(50 μg/ml)、0.1%SDSおよび10%硫酸デキストランを42 °Cで用い、0.2×SSC(塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)および50%ホルムアミド、55 °Cで洗浄した後に、EDTAを含む0.1×SSC、55 °Cによる高ストリンジェンシー洗浄を行う。

10

20

30

40

50

【0022】

「中程度にストリンジェントな条件」は、Sambrook et al., 1989, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, New York: Cold Spring Harbor Pressによって記載されたように特定することができ、これには上記のものよりもストリンジェントでない洗浄液およびハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度およびSDSの%)の使用が含まれる。中程度にストリンジェントな条件の一例は、20%ホルムアミド、5×SSC(150mM NaCl、15mMクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハルト溶液、10%硫酸デキストランおよび20mg/mL変性剪断サケ精子DNAを含む37℃の溶液中で一晩インキュベーションを行い、その後フィルタを1×SSC、約37~50℃で洗浄することである。当業者は、プローブ長などの要因に適応させるために温度、イオン強度などを必要に応じて調整するやり方を認知していると考えられる。

10

【0023】

アミノ酸配列の比較の文脈における「同一性」という用語は、同じ相対位置にある同一なアミノ酸残基の比率を表すために用いられる。同じくこの文脈において「相同性」という用語は、当技術分野で一般に理解されているように、BLAST解析の保存的アミノ酸の基準を用いて同一であるか類似している、同じ相対的位置にあるアミノ酸残基の比率を表すために用いられる。例えば、一致度(% identity)の値は、WU-BLAST-2(Altschul et al., 1996, Methods in Enzymology 266: 460-480; blast.wustl.edu/blast/README.html)によって生成することができる。このような基準の下で保存的とみなされるアミノ酸置換に関する詳細は以下に提示する。そのほかの定義は、以下のサブセクションの全体を通じて提示される。

20

【0024】

以下のセクションでは、本明細書に開示される本発明のさまざまな態様の実施において有用な方法および材料について述べる。以下に提示する例は、乳癌サブタイプにおけるROR1の意義のさらなる描写を可能にする開示を含んでいる。

【0025】

ROR1ポリヌクレオチド

本発明の1つの局面は、ROR1タンパク質およびその断片をコードするポリヌクレオチド、ROR1遺伝子またはmRNA配列もしくはそれらの部分に対して相補的なDNA、RNA、DNA/RNAハイブリッドおよび関連分子、ポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド、ならびにROR1遺伝子、mRNAまたはROR1をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む、好ましくは単離された形態にある、ROR1遺伝子、mRNAおよび/またはコード配列の全体もしくは部分に対応する、またはそれと相補的なポリヌクレオチドを提供する(「ROR1ポリヌクレオチド」と総称)。本明細書で用いる場合、ROR1遺伝子およびタンパク質は、本明細書に具体的に記載されたROR1遺伝子およびタンパク質(例えば、図1を参照されたい)、ならびに他のROR1タンパク質および上記のものと同様に構造的に類似する変異体に対応する遺伝子およびタンパク質を含むものとする。このような他のROR1タンパク質および変異体は、ROR1コード配列との相同性が高いコード配列を一般に有すると考えられ、好ましくはアミノ酸の同一性が少なくとも約80%であってアミノ酸の相同性(BLASTの基準を用いる)が少なくとも約90%であり、より好ましくは相同性(BLASTの基準を用いる)が95%またはそれ以上である。

30

40

【0026】

ROR1ポリヌクレオチドの1つの態様は、図1に示された配列を有するROR1ポリヌクレオチドである。ROR1ポリヌクレオチドには、図1に示されたヒトROR1のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド(TがUであってもよい)；ROR1タンパク質の全体または部分をコードするポリヌクレオチド；前記のものに対して相補的な配列；または前記のものいずれかのポリヌクレオチド断片が含まれ得る。もう1つの態様は、図1に示された配列のうちヌクレオチド残基番号376からヌクレオチド残基番号3189までを有するポリヌクレオチドであり、TがUであってもよい。もう1つの態様は、図1に示されたヒトROR1 cDNAと、またはそのポリヌクレオチド断片とストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリ

50

ダイズし得るポリヌクレオチドである。

【0027】

本明細書に開示する本発明の典型的な態様は、タンパク質およびその断片をコードするもののような、ROR1 mRNA配列の特定の部分を含むROR1ポリヌクレオチド(およびこのような配列に対して相補的なもの)を含む。例えば、本明細書に開示する本発明の代表的な態様は、以下のものを含む：図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸1からほぼアミノ酸10までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸20からほぼアミノ酸30までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸30からほぼアミノ酸40までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸40からほぼアミノ酸50までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸50からほぼアミノ酸60までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸60からほぼアミノ酸70までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸70からほぼアミノ酸80までをコードするポリヌクレオチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸80からほぼアミノ酸90までをコードするポリヌクレオチド、および図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸90からほぼアミノ酸100までをコードするポリヌクレオチドなど。この方式に従い、ROR1タンパク質のアミノ酸100~937のアミノ酸配列の部分をコードするポリヌクレオチドは、本発明の典型的な態様である。ROR1タンパク質のさらに大きな部分をコードするポリヌクレオチドも想定している。例えば、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸1(または20もしくは30もしくは40など)からほぼアミノ酸20(または30もしくは40もしくは50など)までをコードするポリヌクレオチドを、当技術分野で周知のさまざまな技法によって作製することもできる。

10

20

【0028】

ROR1ポリヌクレオチドのそのほかの例示的な態様には、図1に示された配列のうち、ほぼヌクレオチド残基番号1からほぼヌクレオチド残基番号500まで、ほぼヌクレオチド残基番号500からほぼヌクレオチド残基番号1000まで、ほぼヌクレオチド残基番号1000からほぼヌクレオチド残基番号1500まで、ほぼヌクレオチド残基番号1500からほぼヌクレオチド残基番号2000まで、ほぼヌクレオチド残基番号2000からほぼヌクレオチド残基番号2500まで、およびほぼヌクレオチド残基番号2500からほぼヌクレオチド残基番号3358までを有するポリヌクレオチドからなる態様が含まれる。これらのポリヌクレオチド断片は、図1に示されたROR1配列の任意の部分、例えば、図1に示された配列のうちほぼヌクレオチド残基番号376からヌクレオチド残基番号3189までを有するポリヌクレオチドなどを含むことができる。

30

【0029】

前述の諸段落のポリヌクレオチドには、数多くのさまざまな具体的な用途がある。例えば、ヒトROR1遺伝子は染色体1p31.3にマッピングされるため、ROR1タンパク質の異なる領域をコードするポリヌクレオチドを用いて、さまざまな癌と関連性があるものとして同定されている第1番染色体バンドp31上の細胞遺伝学的異常を特徴付けることができる。特に、ヘテロ接合性の消失を含む、1p31.3におけるさまざまな染色体異常は、数多くのさまざまな癌において頻度の高い細胞遺伝学的異常として同定されている(例えば、Matthew et al., 1989, Cancer Res. 1994 Dec 1;54(23): 6265-9; Chunder et al., Pathol Res Tra ct. 2003;199(5): 313-21を参照されたい)。その結果として、ROR1タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、悪性表現型の一因である可能性のある第1番染色体のこの領域における細胞遺伝学的異常の明確な性質を、従来可能であったよりも高い精度で描写するために用い得る、新たなツールを提供する。この文脈において、これらのポリヌクレオチドは、より微細でより頻度の低い染色体異常を同定する目的で染色体スクリーニングの感度を高めるといふ、当技術分野における要求を満たす(例えば、Evans et al., 1994, Am. J. Obstet. Gynecol. 171(4): 1055-1057を参照されたい)。

40

【0030】

または、ROR1は乳癌、特にBRCA1サブタイプおよび基底状サブタイプにおいて異常に発

50

現されることが示されているため、本明細書に開示するポリヌクレオチドを、正常組織および癌性組織におけるROR1遺伝子産物の状態を対比して評価する方法において、ならびに/または乳癌サブタイプを特徴付けるために用いることもできる。典型的には、ROR1タンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドは、細胞におけるROR1 mRNAのレベル、ならびにROR1遺伝子産物の特定の領域における擾乱(欠失、挿入、点変異など)の存在を評価するために用いることができる。例示的なアッセイには、RT-PCRアッセイならびに一本鎖高次構造多型(SSCP)分析の両方が含まれ(例えば、Marrogi et al., 1999, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378)、これらはいずれもタンパク質の特定の領域をコードするポリヌクレオチドをタンパク質内部のこれらの領域を調べるために利用する。

【0031】

本明細書に開示する本発明の具体的に想定している他の態様は、天然の源に由来するものか合成されたものかを問わず、ゲノムDNA、cDNA、リボザイムおよびアンチセンス分子、ならびに代替的な骨格を基にしているか代替的な塩基を含む核酸分子である。例えば、アンチセンス分子はRNAでもよく、ペプチド核酸(PNA)、またはDNAもしくはRNAと塩基対依存的な様式で特異的に結合するホスホロチオエート誘導体などの非核酸分子を含む他の分子でもよい。当業者は、本明細書に開示するROR1ポリヌクレオチドおよびポリヌクレオチド配列を用いて、これらのクラスに属する核酸分子を容易に入手することができる。

【0032】

アンチセンス技術は、細胞内に位置する標的ポリヌクレオチドと結合する外因性オリゴヌクレオチドの投与を伴う。「アンチセンス」という用語は、このようなオリゴヌクレオチドがその細胞内標的、例えばROR1に対して相補的であるという事実を指す。例えば、Jack Cohen, 1988, 「OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression」, CRC Press; および *Synthesis* 1: 1-5 (1988)を参照されたい。本発明のROR1アンチセンスオリゴヌクレオチドには、強化された癌細胞増殖抑制作用を示す、S-オリゴヌクレオチドなどの誘導体(ホスホロチオエート誘導体またはS-オリゴ体、Jack Cohen, 前記)が含まれる。S-オリゴ体(ヌクレオシドホスホロチオエート)は、リン酸基の非架橋酸素原子がイオウ原子によって置換されているオリゴヌクレオチド(0-オリゴ体)の等電性類似体である。本発明のS-オリゴ体は、対応する0-オリゴ体を、イオウ転移試薬である3H-1,2-ベンゾジチオール-3-オン-1,1-ジオキシドで処理することによって調製し得る。Iyer, R. P. et al, 1990, *J. Org. Chem.* 55: 4693-4698; および Iyer, R. P. et al., 1990, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1253-1254を参照されたい(これらの開示内容はすべて本明細書に参照として組み入れられる)。本発明のそのほかのROR1アンチセンスオリゴヌクレオチドには、当技術分野で公知のモルホリノアンチセンスオリゴヌクレオチド(例えば、Partridge et al., 1996, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169-175)が含まれる。

【0033】

本発明のROR1アンチセンスオリゴヌクレオチドは、典型的には、ROR1ゲノム配列または対応するmRNAの最初の100個のN末端コドンまたは最後の100個のC末端コドンと相補的または安定的にハイブリダイズするRNAまたはDNAであってよい。絶対的な相補性は要求されないが、高度の相補性が望ましい。この領域に対して相補的なオリゴヌクレオチドの使用により、プロテインキナーゼの他の調節サブユニットを指定するmRNAに対してではなく、ROR1 mRNAに対して選択的なハイブリダイゼーションが可能となる。好ましくは、本発明のROR1アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ROR1 mRNAとハイブリダイズする配列を有する、アンチセンスDNA分子の15~30mer断片である。任意で、ROR1アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ROR1の最初の10個のN末端コドンおよび最後の10個のC末端コドンにおける領域に対して相補的な30-merオリゴヌクレオチドである。または、アンチセンス分子は、ROR1発現の障害にリボザイムが用いられるように改変される(L. A. Couture & D. T. Stinchcomb, 1996, *Trends Genet.* 12: 510-515)。

【0034】

本発明のこの局面のさらに具体的な態様には、本発明のポリヌクレオチドまたはその任意の特定の部分の特異的増幅を可能とするプライマーおよびプライマー対、ならびに本発

10

20

30

40

50

明の核酸分子またはその任意の部分と選択的または特異的にハイブリダイズするプローブが含まれる。プローブを例えば、放射性同位体、蛍光化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素などの検出マーカーで標識してもよい。このようなプローブおよびプライマーは、試料中のROR1ポリヌクレオチドの存在を検出するために、およびROR1タンパク質を発現する細胞を検出するための手段として用いることができる。

【0035】

このようなプローブの例には、図1に示されたヒトROR1 cDNA配列の全体または部分を含むポリペプチドが含まれる。ROR1 mRNAを特異的に増幅し得るプライマー対の例は、当業者によって容易に作製される。当業者には理解されるであろうが、本明細書に提示した配列に基づいて極めて多くの異なるプライマーおよびプローブを調製し、ROR1 mRNAを増幅および/または検出するために効果的に用いることができる。

10

【0036】

本明細書で用いる場合、ポリヌクレオチドは、それが、ROR1遺伝子以外の遺伝子に対応するかそれに対して相補的な、またはROR1遺伝子産物もしくはその断片以外のものをコードする混入ポリヌクレオチドから実質的に分離されている場合に「単離されている」という。当業者は、単離されたROR1ポリヌクレオチドを得るために核酸単離手順を容易に用いることができる。

【0037】

本発明のROR1ポリヌクレオチドは、ROR1遺伝子、mRNAもしくはその断片の増幅および/または検出のためのプローブおよびプライマーとして；乳癌(例えば、特定の乳癌サブタイプ)および他の癌の診断および/または予後予測のための試薬として；ROR1ポリペプチドの発現を導き得るコード配列として；ROR1遺伝子の発現および/またはROR1転写物の翻訳を調節もしくは抑制するためのツールとして；ならびに治療薬としての使用を非制限的に含む、さまざまな目的のために有用である。

20

【0038】

ROR1をコードする核酸分子の単離

本明細書に記載のROR1 cDNA配列は、ROR1遺伝子産物をコードする他のポリヌクレオチドの単離のほか、ROR1遺伝子産物の相同体、選択的スプライシングを受けたアイソフォーム、対立遺伝子変異体および変異型のROR1遺伝子産物の単離も可能にする。ROR1遺伝子をコードする完全長cDNAを単離するために用い得る、さまざまな分子クローニング法が周知である(例えば、Sambrook, J. et al., 1989, 「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, New York; Ausubel et al., eds., 1995, 「Current Protocols in Molecular Biology」, Wiley and Sonsを参照されたい)。例えば、市販のクローニングシステム(例えば、Lambda ZAP Express, Stratagene)を用いて、ファージクローニング法を都合良く行うことができる。ROR1遺伝子のcDNAを含むファージクローンは、標識したROR1 cDNAまたはその断片をプローブとして探索することによって同定し得る。例えば、1つの態様では、ROR1 cDNA(図1)またはその一部分を合成し、ROR1遺伝子に対応する重複性および完全長cDNAを回収するためのプローブとして用いることができる。ROR1遺伝子自体は、ゲノムDNAライブラリー、細菌人工染色体ライブラリー(BAC)、酵母人工染色体ライブラリー(YAC)などをROR1 DNAプローブまたはプライマーによってスクリーニングすることによって単離し得る。

30

40

【0039】

組換えDNA分子および宿主-ベクター系

本発明は、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、YAC、BACのほか、当技術分野で周知の種々のウイルス性および非ウイルス性ベクターを非制限的に含む、ROR1ポリヌクレオチドを含む組換えDNAまたはRNA分子、ならびにこのような組換えDNAまたはRNA分子による形質転換またはトランスフェクションを受けた細胞も提供する。本明細書で用いる場合、組換えDNAまたはRNA分子とは、インビトロ分子操作を受けたDNAまたはRNA分子のことである。この種の分子を作製するための方法は周知である(例えば、Sambrookら、1989、前記を参照されたい)。

50

【0040】

本発明はさらに、ROR1ポリヌクレオチドを含む組換えDNA分子を適した原核または真核宿主細胞内に含む、宿主-ベクター系も提供する。適した真核宿主細胞の例には、酵母細胞、植物細胞、または哺乳動物細胞もしくは昆虫細胞(例えば、Sf9細胞またはHighFive細胞などのバキュロウイルス感染性細胞)などの動物細胞が含まれる。適した哺乳動物細胞の例には、MDA 231、MCF-7などの種々の乳癌細胞株、トランスフェクションまたは形質導入が可能なその他の前立腺癌細胞株のほか、組換えタンパク質の発現のためにルーチンに用いられる数多くの哺乳動物細胞(例えば、COS、CHO、MCF-3細胞)が含まれる。より詳細には、ROR1のコード配列を含むポリヌクレオチドは、ルーチンに用いられる当技術分野で周知の任意の数の宿主-ベクター系を用いてROR1タンパク質またはその断片を作製するために用いることができる。

10

【0041】

ROR1タンパク質またはその断片の発現のために適した宿主-ベクター系は幅広い種類のものが入手可能である(例えば、Sambrook et al., 1989, 前記; 「Current Protocols in Molecular Biology」, 1995, 前記を参照されたい)。哺乳動物細胞における発現のための一般的なベクターには、pcDNA 3.1 myc-His-tag(Invitrogen)およびレトロウイルスベクター-pSR tkneo(Muller et al., 1991, MCB 11:1785)が非制限的に含まれる。これらの発現ベクターを用いて、例えばMCF-7、rat-1、NIH 3T3およびTsuPr1を含む、いくつかの乳癌細胞株および非乳癌細胞株においてROR1を好ましいように発現させることができる。本発明の宿主-ベクター系は、ROR1タンパク質またはその断片の産生のために有用である。

20

【0042】

組換えヒトROR1タンパク質は、ROR1をコードする構築物がトランスフェクトされた哺乳動物細胞によって産生させることができる。実施例に記載した1つの例示的な態様では、ROR1をコードする発現プラスミドをMCF-7細胞にトランスフェクトし、ROR1タンパク質をMCF-7細胞で発現させており、組換えROR1タンパク質は標準的な精製方法(例えば、抗ROR1抗体を用いるアフィニティー精製)を用いて単離することができる。同じく本明細書の実施例に記載されたもう1つの態様では、ROR1コード配列をレトロウイルスベクター-pSRaMSVtkneo中にサブクロニングし、ROR1を発現する細胞株を樹立することを目的として、NIH 3T3、MCF-7およびrat-1などのさまざまな哺乳動物細胞株を感染させるために用いている。当技術分野で周知のさまざまな他の発現系を用いることもできる。分泌型の組換えROR1タンパク質の作製のために、リーダーペプチドがインフレームにROR1コード配列と連結されたものをコードする発現構築物を用いてもよい。

30

【0043】

ROR1遺伝子またはその断片によってコードされるタンパク質には、抗体の産生、ならびにROR1遺伝子産物と結合するリガンドおよび他の作用因子ならびに細胞成分を同定するための方法におけるものを非制限的に含む、さまざまな用途があると考えられる。ROR1タンパク質またはその断片に対して産生された抗体は、診断アッセイおよび予後予測アッセイ、ならびに乳癌を非制限的に含むROR1タンパク質の発現を特徴とするヒト癌の管理における画像化法において有用と思われる。このような抗体を細胞内で発現させ、この種の癌の患者の治療方法に用いることもできる。さまざまな種類の放射免疫アッセイ、固相酵素免疫アッセイ(ELISA)、固相酵素免疫蛍光アッセイ(ELIFA)、免疫細胞化学法などを非制限的に含む、ROR1タンパク質の検出のために有用な種々の免疫アッセイを想定している。このような抗体を標識し、前立腺細胞を検出し得る免疫学的画像化試薬として用いることもできる(例えば、放射シンチグラフィ画像法において)。また、ROR1タンパク質は以下に詳細に述べる癌ワクチンの作製にも特に有用と思われる。

40

【0044】

ROR1ポリペプチド

本発明のもう1つの局面は、ROR1タンパク質およびそのポリペプチド断片を提供する。

50

本発明のROR1タンパク質には、本明細書で具体的に特定されたもののほか、以下に概説する方法に従って、過度の実験を行わなくとも単離/作製および特性決定を行い得る、対立遺伝子変異体、保存置換変異体および相同体が含まれる。異なるROR1タンパク質またはその断片の部分を組み合わせた融合タンパク質のほか、ROR1タンパク質と異種ポリペプチドとの融合タンパク質も含まれる。このようなROR1タンパク質は、ROR1タンパク質、本発明のタンパク質、またはROR1として総称するものとする。本明細書で用いる場合、「ROR1ポリペプチド」という用語は、少なくとも6アミノ酸、好ましくは少なくとも15アミノ酸からなるポリペプチド断片またはROR1タンパク質を意味する。

【0045】

ROR1タンパク質の具体的な態様には、図1に示されたヒトROR1のアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。または、ROR1タンパク質の態様には、図1に示されたヒトROR1のアミノ酸配列中に改変を有する変異型ポリペプチドも含まれる。

10

【0046】

一般に、ヒトROR1の天然の対立遺伝子変異体は、高度の構造的同一性および相同性を有すると考えられる(例えば、同一性が90%またはそれ以上)。典型的には、ROR1タンパク質の対立遺伝子変異体は、本明細書に記載するROR1配列中に保存的アミノ酸置換を含むか、またはROR1相同体における対応位置に由来するアミノ酸置換を含むと考えられる。あるクラスのROR1対立遺伝子変異体は、特定のROR1アミノ酸配列の少なくともわずかな領域とは高度の相同性を有するものの、非保存的置換、切断、挿入またはフレームシフトといった配列との根本的な差異をさらに含むタンパク質であると考えられる。

20

【0047】

保存的アミノ酸置換は、タンパク質の立体構造および機能をいずれも変化させずにタンパク質に加えることが往々にして可能である。このような変化には、イソロイシン(I)、バリン(V)およびロイシン(L)のいずれかによるそれ以外のこれらの疎水性アミノ酸の置換、アスパラギン酸(D)によるグルタミン酸(E)の置換およびその逆、グルタミン(Q)によるアスパラギン(N)の置換およびその逆、ならびにセリン(S)によるトレオニン(T)の置換およびその逆が含まれる。タンパク質の三次元構造における特定のアミノ酸の環境およびその役割によっては、その他の置換も保存的とみなし得る。例えば、グリシン(G)およびアラニン(A)はしばしば互換的であり、アラニン(A)およびバリン(V)についても同様である。比較的疎水性が高いメチオニン(M)は、ロイシンおよびイソロイシンとしばしば互換的であり、時にバリンと互換的である。リジン(K)およびアルギニン(R)は、アミノ酸残基の顕著な特徴がその電荷にあって、これらの2つのアミノ酸残基のpKの違いが重大でない位置ではしばしば互換的である。特定の環境においては、さらに他の変化も「保存的」とみなすことができる。

30

【0048】

本明細書に開示する本発明の態様には、アミノ酸の挿入、欠失および置換を有するポリペプチドのような、ROR1タンパク質の当技術分野で認められている多種多様な変異体が含まれる。ROR1変異体は、部位特異的変異誘発法、アラニンスキャニング法およびPCR変異誘発法といった、当技術分野で公知の方法を用いて作製することができる。部位特異的変異誘発法(Carter et al., 1986, Nucl. Acids Res. 13: 4331; Zoller et al., 1987, Nucl. Acids Res. 10: 6487)、カセット変異誘発法(Wells et al., 1985, Gene 34: 315)、制限選択変異誘発法(Wells et al., 1986, Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A, 317: 415)または他の公知の技法を、クローニングされたDNAに対して実施し、ROR1の変異型DNAを作製することができる。また、連続した配列に沿って1つまたは複数のアミノ酸を同定するためにスキャニングアミノ酸分析を用いることもできる。一般的なスキャニング用アミノ酸は、比較的小型で中性のアミノ酸である。このようなアミノ酸にはアラニン、グリシン、セリンおよびシステインが含まれる。この群の中ではアラニンがよく用いられるスキャニング用アミノ酸であり、これは炭素を越える側鎖がなく、変異体の主鎖コンフォメーションを変化させる可能性が低いためである。アラニンは最もよくみられるアミノ酸であるという理由からも一般的に用いられる。さらに、これは埋没位置および露出位置

40

50

のいずれにおいても高頻度に認められる (Creighton, 「The Proteins」 (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, 1976, J. Mol. Biol., 150:1)。アラニン置換で十分な量の変異体が得られない場合には、等電子的なアミノ酸を用いることができる。

【0049】

以上に考察したように、特許請求される本発明の態様には、図1に示されたROR1タンパク質のうち937アミノ酸未満の配列を含むポリペプチド(およびこのようなポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)が含まれる。例えば、本明細書に開示される本発明の代表的な態様には、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸1からほぼアミノ酸10までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸20からほぼアミノ酸30までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸30からほぼアミノ酸40までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸40からほぼアミノ酸50までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸50からほぼアミノ酸60までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸60からほぼアミノ酸70までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸70からほぼアミノ酸80までからなるポリペプチド、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸80からほぼアミノ酸90までからなるポリペプチド、および、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸90からほぼアミノ酸100までからなるポリペプチドなどが含まれる。この方式に従い、ROR1タンパク質のアミノ酸100～937のアミノ酸配列からなるポリペプチドは、本発明の1つの典型的な態様である。ROR1タンパク質のより大きな部分からなるポリペプチドも想定している。例えば、図1に示されたROR1タンパク質のほぼアミノ酸1(または20もしくは30もしくは40など)からほぼアミノ酸20(または30もしくは40もしくは50など)までからなるポリペプチドを、当技術分野で周知のさまざまな技法によって作製することもできる。

【0050】

前述の諸段落のポリヌクレオチドには、数多くのさまざまな具体的な用途がある。ROR1は、対応する正常乳房組織と比べて特定の乳癌サブタイプで高度に発現されることが示されているため、これらのポリペプチドを、正常組織および癌性組織におけるROR1遺伝子産物の状態を対比して評価する方法において、ならびに悪性表現型を解明するために用いることもできる。典型的には、ROR1タンパク質の特定の領域をコードするポリペプチドは、ROR1遺伝子産物の特定の領域における擾乱(欠失、挿入、点変異など)の存在を評価するために用いることができる。例示的なアッセイは、ROR1ポリペプチド配列内部に含まれる生物学的モチーフの1つまたは複数のアミノ酸残基を含むROR1ポリペプチドを標的とする抗体を、正常組織および癌性組織におけるこの領域の特徴を評価することを目的として利用することができる。または、ROR1ポリペプチド配列内部に含まれる生物学的モチーフの1つまたは複数のアミノ酸残基を含むROR1ポリペプチドを、ROR1のその領域と相互作用する因子に関するスクリーニングのために用いることもできる。

【0051】

以上に考察したように、遺伝暗号の冗長性はROR1遺伝子配列における差異を可能にする。特に、当業者は、特定の宿主種による特定のコドン選好性を認識していると考えられ、開示された配列を所望の宿主に対する好ましいものとして適合させることができる。例えば、ある種のコドン配列は一般に、稀なコドン(すなわち、所望の宿主の既知の配列における使用頻度が約20%未満であるコドン)がより頻度の高いコドンに置き換えられている。特定の生物に関するコドン選好性は、例えば、インターネットの以下のアドレス：www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.htmlから入手可能なコドン使用頻度の表を利用することによって算出し得る。使用頻度が約20%未満である任意のコドンを置換することによって特定の宿主に対して最適化されたヌクレオチド配列を、本明細書では「コドンが最適化された配列」と称する。

【0052】

そのほかの配列改変が細胞宿主におけるタンパク質発現を増強することも公知である。これらには、偽性ポリアデニル化シグナル、エクソン/イントロンスプライス部位シグナ

ル、トランスポゾン様反復配列、および/または遺伝子発現にとって有害と考えられる詳細に特性が解明されている他のこのような配列をコードする配列の除去が含まれる。配列のGC含有量を、宿主細胞で発現される既知の遺伝子を参照することによって算出されるような、所定の細胞宿主に関する平均のレベルに調整することもできる。可能であれば、予想されるヘアピン型二次mRNA構造を回避するために配列を改変してもよい。その他の有用な改変には、Kozak, 1989, Mol. Cell Biol., 9:5073-5080に記載されたような、オープンリーディングフレームの開始部への翻訳開始コンセンサス配列の付加が含まれる。コード最適化に加えて、偽性ポリアデニル化配列の除去、エクソン/イントロンスプライスシグナルの除去、トランスポゾン様反復配列の除去、および/またはGC含有量の最適化により、所定の宿主種における発現のために最適化されたヌクレオチド配列を、本明細書では「発現が増強された配列」と称する。 10

【0053】

ROR1タンパク質は多くの形態として具現化し得るが、単離された形態が好ましい。本明細書で用いる場合、タンパク質は、物理的、機械的または化学的方法を用いて、ROR1タンパク質が、タンパク質に通常付随する細胞成分から切り離された場合に「単離された」という。当業者は、標準的な精製法を容易に用いて、単離されたROR1タンパク質を得ることができる。精製されたROR1タンパク質分子は、ROR1と抗体または他のリガンドとの結合を妨げる他のタンパク質または分子を実質的に含まないと考えられる。単離および精製の性質および程度は、意図する用途によって決まると考えられる。ROR1タンパク質の態様には、精製されたROR1タンパク質および機能的な可溶性ROR1タンパク質が含まれる。1つの形態において、このような機能的な可溶性ROR1タンパク質またはその断片は、抗体または他のリガンドとの結合能を保っている。 20

【0054】

本発明はまた、図1に示されたROR1のアミノ酸配列の一部に対応するポリペプチドなどの、ROR1アミノ酸配列の生物活性断片を含むROR1ポリペプチドも提供する。本発明のこの種のポリペプチドは、ROR1タンパク質に付随するエピトープと特異的に結合する抗体の産生を誘発する能力というような、ROR1タンパク質の特性を示す。

【0055】

ROR1ポリペプチドは、本明細書に開示するヒトROR1タンパク質のアミノ酸配列に基づき、当技術分野で周知の標準的なペプチド合成技術または化学的切断法を用いて作製することができる。または、ROR1タンパク質のポリペプチド断片をコードする核酸分子を得るために組換え法を用いることも可能である。この点に関して、本明細書に記載のROR1をコードする核酸分子は、ROR1タンパク質の規定された断片を作製するための手段を提供する。ROR1ポリペプチドは、ドメイン特異的抗体(例えば、ROR1タンパク質の細胞外または細胞内エピトープを認識する抗体)の作製および特性決定、ROR1または特定の構造ドメインと結合する作用因子または細胞因子の同定、ならびに癌ワクチンを非制限的に含む種々の治療状況において特に有用である。 30

【0056】

特に興味深い構造を含むROR1ポリペプチドは、例えば、Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Katplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析の方法を含む当技術分野で周知のさまざまな分析法を用いて、または免疫原性に基づいて、予測および/または同定することが可能である。このような構造を含む断片は、サブユニット特異的な抗ROR1抗体の作製、またはROR1と結合する細胞因子の同定に特に有用である。 40

【0057】

以下の例において記載される1つの態様では、C末端に6XHisおよびMYCタグを有するROR1をコードする、CMVにより作動する発現ベクター(pcDNA3.1/mycHis, InvitrogenまたはTag5, GenHunter Corporation, Nashville TN)などの市販の発現ベクターがトランスフェクトされた細胞(MCF-7細胞など)でROR1を首尾良く発現させることができる。Tag5ベクターは、トランスフェクト細胞における分泌性ROR1タンパク質の産生を容易にするために用い得るIgGK分泌シグナルを付与する。培地中の分泌性Hisタグ付加ROR1は、ニッケルカラム 50

を用い、標準的な技法を用いて精製することができる。

【0058】

本発明のROR1を、ROR1が別の異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列と融合したものを含むキメラ分子が生じるような様式で変更することもできる。1つの態様において、このようなキメラ分子は、ROR1と、固定化されたニッケルが選択的に結合し得るエピトープを付与するポリヒスチジンエピトープタグとの融合物を含む。エピトープタグは一般に、ROR1のアミノ末端またはカルボキシル末端に配置される。1つの代替的な態様において、キメラ分子は、ROR1と免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定の領域との融合物を含む。二価型のキメラ分子(「イムノアドヘシン」とも呼ばれる)に関しては、このような融合物はIgG分子のFc領域に対するものであり得る。Ig融合物には、好ましくは、Ig分子内部の少なくとも1つの可変領域の代わりに可溶性(膜貫通ドメインが除去または不活性化された)型のROR1ポリペプチドがある置換を含む。特定の態様において、免疫グロブリン融合物は、IgG1分子のヒンジ、CH2およびCH3、またはヒンジ、CH1、CH2およびCH3領域を含む。免疫グロブリン融合物の作製に関しては、1995年6月27日に発行された米国特許第5,428,130号も参照されたい。

10

【0059】

本発明のいくつかの態様において、融合タンパク質は、ROR1のIg様C2型ドメイン(SEQ ID NO: 2のQ73-V139)のみを含む。本発明のいくつかの態様において、融合タンパク質はROR1のfrizzledドメイン(SEQ ID NO: 2のE165-I299)のみを含む。本発明のいくつかの態様において、融合タンパク質はROR1のkringleドメイン(SEQ ID NO: 2のK312-C391)のみを含む。本発明のまた別の態様において、融合タンパク質はこれらのROR1ドメインの2つ、または代替的には3つを含む。

20

【0060】

ROR1抗体

「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、特に単独の抗ROR1モノクローナル抗体(アゴニスト、アンタゴニストおよび中和抗体を含む)および多エピトープ特異性を有する抗ROR1抗体組成物を範囲に含む。本明細書で用いる「モノクローナル抗体」(mAb)という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体のことを指し、すなわち、個々の集団を構成する抗体は、微量に存在する可能性のある天然の変異を例外として同一である。

30

【0061】

本発明のもう1つの局面は、ROR1タンパク質およびポリペプチドと結合する抗体を提供する。最も一般的な抗体は、ROR1タンパク質とは特異的に結合するが、ROR1でないタンパク質およびポリペプチドとは結合しない(または弱くしか結合しない)と考えられる。特に想定している抗ROR1抗体には、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のほか、これらの抗体の抗原結合ドメインおよび/または1つもしくは複数の相補性決定領域を含む断片が含まれる。

【0062】

本発明のROR1抗体は、乳癌の診断アッセイおよび予後予測アッセイ、ならびに画像化法において特に有用と思われる。細胞内で発現される抗体(例えば、一本鎖抗体)は、ROR1の発現が関係している癌、例えば進行性および転移性の乳癌の治療において治療的に有用と思われる。このような抗体は、乳癌などの他の型の癌においてROR1もまた発現または過剰発現される範囲で、他の癌の治療、診断および/または予後予測にも有用と思われる。

40

【0063】

本発明はまた、ROR1および変異型ROR1タンパク質およびポリペプチドの検出および定量のために有用なさまざまな免疫学的アッセイも提供する。このようなアッセイ系は一般に、ROR1または変異型ROR1を認識してそれと結合することが可能な1つまたは複数のROR1抗体を含み、さまざまな種類のラジオイムノアッセイ、固相酵素免疫アッセイ(ELISA)、酵素結合免疫蛍光アッセイ(ELIFA)などを非制限的に含む、当技術分野で周知のさまざまな免疫学的アッセイ形式で行うことができる。さらに、標識したROR1抗体を用いる放射性シ

50

ンチグラフィー画像化法を非制限的に含む、ROR1を発現している乳癌および他の癌を検出し得る免疫学的画像化法も、本発明により提供される。このようなアッセイは、乳癌のようにROR1を発現する癌の検出、モニタリングおよび予後予測において臨床的に有用であると思われる。

【0064】

ROR1抗体を、ROR1および変異型ROR1タンパク質ならびにポリペプチドを精製するため、ならびにROR1相同体および関連分子を単離するための方法に用いることもできる。例えば、1つの態様において、ROR1タンパク質を精製する方法は、ROR1抗体とROR1との結合を許容する条件下で、固体基質に結合させたROR1抗体をROR1を含む溶解液または他の溶液とともにインキュベートする段階；不純物を除去するために固体基質を洗浄する段階；および、結合した抗体からROR1を溶出させる段階を含む。本発明のROR1抗体のその他の用途には、ROR1タンパク質を模倣する抗イデオタイプ抗体の作製が含まれる。

10

【0065】

抗体の調製のための方法はさまざまなものが当技術分野で周知である。例えば、単離された形態または免疫複合体の形態にあるROR1タンパク質、ペプチドまたは断片を用いて適した哺乳動物宿主の免疫処置を行うことにより、抗体を調製することができる(Harlow and Lane, eds., 1988, 「Antibodies: A Laboratory Manual」, CSH Press; Harlow, 1989, 「Antibodies」, Cold Spring Harbor Press, NY)。さらに、ROR1 GST-融合タンパク質といったROR1の融合タンパク質を用いることもできる。特定の態様において、図1のオープニングフレームのアミノ酸配列の全体または大部分を含むGST融合タンパク質を作製し、適切な抗体を作製するための免疫原として用いることができる。もう1つの態様において、ROR1ペプチドを合成して免疫原として用いてもよい。

20

【0066】

さらに、当技術分野で公知である裸のDNAの免疫処置法を、コードされる免疫原に対する免疫応答を生じさせるために(精製されたROR1タンパク質もしくはROR1発現細胞とともに、または伴わずに)用いることもできる(総説に関しては、Donnelly et al, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15:617-648を参照されたい)。

【0067】

図1に示されたROR1のアミノ酸配列を、抗体の作製を目的としてROR1タンパク質の特定の領域を選択するために用いてもよい。例えば、ROR1アミノ酸配列の疎水性および親水性分析を用いて、ROR1構造における親水性領域を同定することができる。Chou-Fasman、Garnier-Robson、Kyte-Doolittle、Eisenberg、Karplus-SchultzまたはJameson-Wolf分析などの当技術分野で知られた他の種々の方法を用いて、免疫原性構造が認められるROR1タンパク質の領域のほか、他の領域およびドメインを容易に用いることもできる。

30

【0068】

免疫原として用いるためのタンパク質またはポリペプチドを調製するため、およびタンパク質とBSA、KLHまたは他の担体タンパク質などの担体との免疫原性結合物を調製するための方法は、当技術分野で周知である。ある状況では例えばカルボジイミド試薬を用いる直接的結合を用いることができ、別の状況ではPierce Chemical Co.(Rockford, IL)が供給しているものなどの結合剤が有効と思われる。ROR1免疫原の投与は一般に、当技術分野で一般に理解されているように、適切な期間にわたる注射および適切なアジュバントを用いて行われる。免疫処置の期間中には、抗体形成が十分なことを判定するために抗体力価を測定することが可能である。

40

【0069】

ROR1モノクローナル抗体は、当技術分野で周知のさまざまな手段によって作製し得る。例えば、一般に公知であるように、リンパ球または脾細胞の不死化をもたらす、KohlerおよびMilsteinの標準的な方法または変法を用いて、所望のモノクローナル抗体を分泌する不死化細胞株を調製することができる。所望の抗体を分泌する不死化細胞株を、ROR1タンパク質またはROR1断片を抗原とするイムノアッセイによってスクリーニングする。所望の抗体を分泌する適切な不死化細胞培養物が同定された時点で、細胞を増殖させてインビト

50

口培養物または腹水から抗体を得ることができる。

【0070】

抗体または断片を、組換え手段による現行の技術を用いて作製することもできる。ROR1タンパク質の所望の領域と特異的に結合する領域を、複数の種に由来するキメラ抗体またはCDRグラフト化抗体の状況で作製することもできる。ヒト化またはヒトROR1抗体を作製することもでき、これらは治療的状況で用いるのに好ましい。非ヒト抗体CDRの1つまたは複数に対応するヒト抗体配列によって置き換えることによって、マウス抗体およびその他の非ヒト抗体をヒト化するための方法は周知である(例えば、Jones et al., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen, 1988, Science 239: 1534-1536を参照されたい)。同じく、Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285およびSims et al., 1993, J. Immunol. 151: 2296も参照されたい。完全ヒトモノクローナル抗体の作製のための方法には、ファージディスプレイ法およびトランスジェニック法が含まれる(総説については、Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539を参照されたい)。

【0071】

完全ヒトROR1モノクローナル抗体を、大規模なヒトIg遺伝子コンビナトリアルライブラリーを用いるクローニング技術(すなわち、ファージディスプレイ)を用いて作製することもできる(Griffiths and Hoogenboom, 「Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries」. Clark, M. ed, 1993, 「Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man」中, Nottingham Academic, pp 45-64; Burton and Barbas, 「Human Antibodies from combinatorial libraries」, 同上, pp 65-82)。また、1997年12月3日に公開されたKucherlapatiおよびJakobovitsらのPCT特許出願W098/24893号に記載されたように、完全ヒトROR1モノクローナル抗体を、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むように操作されたトランスジェニックマウスを用いて産生させることもできる(同じく、Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4):607-614も参照されたい)。この方法では、ファージディスプレイ技術では必要なインピット操作が必要なく、信頼性のある高親和性ヒト抗体を効率的に産生させることができる。

【0072】

ROR1抗体のROR1タンパク質との反応性は、ROR1タンパク質、ペプチド、ROR1発現細胞またはその抽出物を適宜用いる、ウエスタンブロット法、免疫沈降、ELISAおよびFACS分析を含む、周知の数多くの手段によって確認し得る。

【0073】

本発明のROR1抗体またはその断片を、検出マーカーによって標識すること、または第2の分子と結合させることもできる。適した検出マーカーには、放射性同位体、蛍光性化合物、生物発光化合物、化学発光化合物、金属キレート剤または酵素が非制限的に含まれる。ROR1抗体と結合させるための第2の分子は、意図する用途に応じて選択することができる。例えば、治療用途の場合、第2の分子は毒素または治療薬であり得る。さらに、2つまたはそれ以上のROR1エピトープに対して特異的な二重特異性抗体を、当技術分野で一般的に公知の方法を用いて作製することもできる。ホモ二量体性抗体を当技術分野で公知の架橋法によって作製することもできる(例えば、Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565)。

【0074】

本発明の1つの例示的な態様は、図1に示されたROR1ポリペプチド配列(SEQ ID NO: 2)と特異的に結合する単離された抗体である。任意で、この単離された抗体は、ROR1の細胞外領域(SEQ ID NO: 2のM1-V406)と特異的に結合する。本発明のいくつかの特定の態様において、単離された抗体は、ROR1のIg様C2型ドメイン(SEQ ID NO: 2のQ73-V139)と特異的に結合する。本発明のまた別の態様において、単離された抗体は、ROR1のfrizzledドメイン(SEQ ID NO: 2のE165-I299)と特異的に結合する。本発明のまた別の態様において、単離された抗体は、ROR1のkringleドメイン(SEQ ID NO: 2のK312-C391)と特異的に結合する。

【0075】

本発明のもう1つの態様は、細胞毒性部分とこれらの抗体の1つとの結合物であるイムノトキシンである。任意で、抗体は、ROR1と特異的に結合する抗原結合領域を含む抗体断片(例えば、Fab断片)である。典型的には、これらの抗体の1つまたは複数は、ROR1をダウンレギュレートする、および/または抗体の有効量が投与された患者において補体を活性化し得る、および/または抗体の有効量が投与された患者において抗体依存性細胞傷害を媒介し得ると考えられる。本発明のいくつかの特定の態様において、これらの抗体の1つまたは複数は、抗体の有効量が投与された患者において腫瘍量をなくす、および/または減少させる。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌である。本発明のもう1つの関連した態様は、ROR1と特異的に結合するこれらの抗体の1つを産生するハイブリドーマである。本発明のもう1つの関連した態様は、ROR1と特異的に結合するこれらの抗体の1つ、および薬学的に許容される担体を含む組成物である。本発明のさらにもう1つの態様は、細胞をこれらの抗体の1つに曝露させる段階、および続いて抗体と細胞との結合の程度を判定する段階を含む、腫瘍(例えば、乳癌)を検出するためのアッセイである。

10

【0076】

本発明の1つの関連した態様は、ROR1の細胞外ドメインと特異的に結合し、抗体の有効量を投与された患者におけるROR1を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を抑制する抗体である。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌である。任意で、抗体はマウスモノクローナル抗体である。典型的には、抗体は、ROR1をダウンレギュレートする、および/または抗体の有効量が投与された患者において補体を活性化し得る、および/または患者における抗体依存性細胞傷害を媒介し得ると考えられる。本発明の1つの関連した態様は、細胞毒性部分とこの抗体との結合物であるイムノトキシンである。本発明のもう1つの関連した態様は、この抗体を産生するハイブリドーマである。

20

【0077】

本発明のもう1つの態様は、ROR1と特異的に結合し、約0.5、1、5、10または30 $\mu\text{g/ml}$ の抗体濃度で、細胞培養下にあるHCC1187、Ca151、MB468、MDA-MB-231、HCC1395、HS578T、HCC70、HCC1143、HCC1937、HCC2157、MDA-MB-436、BT-20、184A1、MB157、MCF12A、184B5またはColo824腫瘍細胞(例えば、図5を参照されたい)の増殖を20%以上抑制する抗体である。典型的には、これらの腫瘍細胞は10%ウシ胎仔血清を含む培地中で培養され、増殖抑制は抗体に対する腫瘍細胞の曝露から約6日後に判定される。典型的には、この抗体はモノクローナル抗体である。任意で、このモノクローナル抗体はROR1の細胞外領域(SEQ ID NO: 2のM1-V406またはQ30-V406)と結合する。本発明のいくつかの特定の態様において、モノクローナル抗体はROR1のIg様C2型ドメイン(SEQ ID NO: 2のQ73-V139)と結合する。本発明のまた別の態様において、モノクローナル抗体はROR1のfrizzledドメイン(SEQ ID NO: 2のE165-1299)と結合する。本発明のまた別の態様において、モノクローナル抗体はROR1のkringleドメイン(SEQ ID NO: 2のK312-C391)と結合する。本発明のいくつかの態様において、この抗体は、このポリペプチドを過剰発現する腫瘍細胞上のROR1をダウンレギュレートし、この抗体の治療的有効量を投与された患者における腫瘍細胞の増殖を抑制する。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌である。典型的には、抗体は患者において補体を活性化し得る、および/または患者において抗体依存性細胞傷害を媒介し得る。本発明の1つの関連した態様は、細胞毒性部分とこの抗体との結合物であるイムノトキシンである。本発明のもう1つの関連した態様は、この抗体を産生するハイブリドーマである。

30

40

【0078】

本発明のさらにもう1つの態様は、ROR1を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、ROR1の細胞外ドメインと特異的に結合する抗体を、患者における腫瘍細胞の増殖を抑制するのに有効な量として患者に投与する段階を含む方法である。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌で

50

ある。典型的には、抗体は患者において補体を活性化し得る、および/または患者において抗体依存性細胞傷害を媒介し得る。本発明の1つの関連した態様は、細胞毒性部分とこの抗体との結合物であるイムノトキシンである。本発明のもう1つの関連した態様は、この抗体を産生するハイブリドーマである。

【0079】

本発明のさらにもう1つの態様は、ROR1を過剰発現する腫瘍細胞の増殖を抑制する方法であって、ROR1の細胞外ドメイン特異的に結合する抗原結合領域を含む抗体を、患者における腫瘍細胞の増殖を抑制するのに有効な量として患者に投与する段階を含み、抗体が細胞毒性部分と結合していないような方法である。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌である。本発明の1つの関連した態様は、ROR1を過剰発現する癌を治療する方法であって、ROR1の細胞外ドメインと特異的に結合する抗原結合領域を含む抗体を、患者の腫瘍量をなくすまたは減少させるのに有効な量として患者に投与する段階を含み、抗体が細胞毒性部分と結合していない方法である。任意で、患者は乳癌を有する。本発明のさらにもう1つの態様は、癌を治療する方法であって、HER2遺伝子の過剰発現および/またはROR1の過剰発現を特徴とする癌の患者を特定する段階、およびこのようにして特定された患者に、ROR1の細胞外ドメインと特異的に結合する抗原結合領域を含む抗体を、患者の癌の増殖を抑制するのに有効な量として投与する段階を含む方法である。

【0080】

本発明のもう1つの態様は、ROR1を過剰発現する癌を有する患者を治療する方法であって、ROR1の細胞外ドメインと特異的に結合する抗体を、患者の腫瘍量をなくすまたは減少させるのに有効な量として患者に投与する段階を含む方法である。本発明のいくつかの特定の態様において、腫瘍細胞はBRCA1および/または基底状サブタイプのヒト乳癌である。典型的には、この抗体はモノクローナル抗体である。本発明のいくつかの態様において、この抗体はこのポリペプチドを過剰発現する腫瘍細胞上のROR1をダウンレギュレートし、この抗体の治療的有効量を投与された患者における腫瘍細胞の増殖を抑制する。典型的には、抗体は患者において補体を活性化し得る、および/または患者において抗体依存性細胞傷害を媒介し得る。本発明の1つの関連した態様は、細胞毒性部分とこの抗体との結合物であるイムノトキシンである。本発明のもう1つの関連した態様は、この抗体を産生するハイブリドーマである。

【0081】

本発明のまた別の関連した態様は、乳癌を含む病的状態の治療のための医薬品の調製のための方法であって、病的状態を有する哺乳動物に対する投与のための抗ROR1抗体組成物を調製することによる方法である。1つの関連した方法は、乳癌の治療のための医薬品の調製における抗ROR1抗体の有効量の使用である。もう1つの関連した方法は、基底状乳癌の治療のための医薬品の調製における抗ROR1抗体の有効量の使用である。1つの関連した方法は、BRCA1乳癌の治療のための医薬品の調製における抗ROR1抗体の有効量の使用である。さらにもう1つの関連した態様は、患者におけるROR1の作用を阻害するための医薬品の製造における抗ROR1抗体の使用である。このような方法は、典型的には、インビボでROR1シグナル伝達を阻害するのに十分な量の抗ROR1抗体、および適切な量の生理学的に許容される担体を含める段階を含む。当技術分野で公知であるように、任意で、他の作用因子をこれらの調製物に含めることもできる。

【0082】

ROR1トランスジェニック動物

ROR1またはその改変型をコードする核酸を、トランスジェニック動物または「ノックアウト」動物を作製するために用いることもでき、これらは以後、治療的に有用な試薬の開発およびスクリーニングに有用である。トランスジェニック動物(例えば、マウスまたはラット)とは、導入遺伝子が出生前、例えば胚形成期にある動物または動物の先祖に導入されている、導入遺伝子を含む細胞を有する動物のことである。導入遺伝子とは、トランスジェニック動物が発生する元となる細胞のゲノム中に組み込まれたDNAのことである。1

10

20

30

40

50

つの態様において、ROR1をコードするcDNAを確立された技法に従って用いて、ROR1をコードするゲノムDNAをクローニングし、それらのゲノム配列を、ROR1をコードするDNAを発現する細胞を含むトランスジェニック動物の作製のために用いることができる。トランスジェニック動物、特にマウスまたはラットなどの動物を作製するための方法は、当技術分野で慣例的となっており、例えば、米国特許第4,736,866号および第4,870,009号に記載されている。典型的には、組織特異的エンハンサーを用いて、特定の細胞がROR1導入遺伝子の組み入れの標的とされる。胚形成期にある動物の生殖系列に導入された、ROR1をコードする導入遺伝子のコピーを含むトランスジェニック動物は、ROR1をコードするDNAの発現増大の影響を調べるために用いることができる。このような動物は、例えば、その過剰発現と関連性のある病的状態に対する防御を付与すると考えられる試薬に関する試験用動物として用いることができる。本発明のこの面によれば、動物に試薬を投与し、病的状態の発生率が、導入遺伝子を有する非投与動物と比べて低いことにより、病的状態に対する治療介入に見込みがあることが示されると考えられる。

10

20

30

40

50

【0083】

または、ROR1の非ヒト相同体を、ROR1をコードする内因性遺伝子と、動物の胚細胞に導入されたROR1をコードする改変ゲノムDNAとの間での相同組換えの結果として、ROR1をコードする欠陥遺伝子または改変遺伝子を有するROR1「ノックアウト」動物を構築するために用いることもできる。例えば、ROR1をコードするcDNAを、確立された技法に従って、ROR1をコードするゲノムDNAのクローニングのために用いることができる。ROR1をコードするゲノムDNAの一部を除去するか、組込みをモニターするために用い得る選択マーカーをコードする遺伝子などの別の遺伝子によって置換することができる。典型的には、数キロベースの非改変隣接DNA(5'末端および3'末端の両方)をベクターに含める(相同組換えベクターの説明に関しては、例えば、Thomas and Capecchi, 1987, Cell 51:503を参照されたい)。ベクターを胚幹細胞系に導入し(例えば、電気穿孔法により)、導入DNAが内因性DNAと相同的に組み換えられた細胞を選択する(例えば、Li et al., 1992, Cell 69:915を参照されたい)。続いて、選択した細胞を動物(例えば、マウスまたはラット)の胚盤胞に注入して、凝集キメラを形成させる(例えば、Robertson, ed., 1987, 「Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach」(IRL, Oxford)中の、Bradley, pp.113-152を参照されたい)。続いて、キメラ胚を適した偽妊娠代理母動物に移植し、胚を出産するまで育てて「ノックアウト」動物を作出する。生殖細胞に相同組換えDNAを有する子孫は標準的な技法によって同定することができ、動物のすべての細胞が相同組換えDNAを含んでいる動物を交配によって作り出すことができる。ノックアウト動物を例えば、特定の病的状態に対する防御能、およびROR1ポリペプチドの欠如に起因する病的状態の発生に関して調べることができる。

【0084】

ROR1の検出のための方法

本発明のもう1つの局面は、ROR1ポリヌクレオチドおよびROR1タンパク質およびそれらの変異体を検出するための方法、ならびにROR1を発現する細胞を同定するための方法に関する。ROR1の発現プロファイルは、これを乳癌および乳癌サブタイプの見込みのある診断マーカーとさせている。この文脈において、ROR1遺伝子産物の状態は、進行期疾患に対する感受性、進行の速度、および/または腫瘍の悪性度を含む、さまざまな因子を予測するために有用な情報を与える可能性がある。以下に詳細に考察するように、患者試料におけるROR1遺伝子産物の状態は、免疫組織化学分析、種々のノーザンブロット法(インサイチュハイブリダイゼーションを含む)、RT-PCR分析(例えばレーザーマイクロダイセクションを行った試料に対して)、ウエスタンブロット分析および組織アレイ分析を含む、当技術分野で周知のさまざまなプロトコールによって分析することができる。

【0085】

より詳細には、本発明は、乳癌生検試料などの生物試料におけるROR1ポリヌクレオチドの検出のためのアッセイを提供する。検出可能なROR1ポリヌクレオチドには、例えば、ROR1遺伝子またはその断片、ROR1 mRNA、選択的スプライス変異体ROR1 mRNA、およびROR1ポ

リヌクレオチドを含む組換えDNAまたはRNA分子が含まれる。ROR1ポリヌクレオチドの増幅および/またはその存在の検出を行うための数多くの方法が当技術分野では周知であり、本発明のこの局面の実施に用いることができる。

【0086】

1つの態様において、生物試料中のROR1 mRNAを検出するための方法は、少なくとも1つのプライマーを用いる逆転写によって試料からcDNAを作製する段階、そのようにして作製したcDNAをその中のROR1 cDNAを増幅するためにROR1ポリヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いて増幅する段階、ならびに増幅されたROR1 cDNAの存在を検出する段階を含む。任意で、増幅されたROR1 cDNAの配列を決定することもできる。もう1つの態様において、生物試料中のROR1遺伝子を検出するための方法は、まず試料からゲノムDNAを単離する段階、単離されたゲノムDNAをその中のROR1遺伝子を増幅するためにROR1ポリヌクレオチドをセンスおよびアンチセンスプライマーとして用いて増幅する段階、ならびに増幅されたROR1遺伝子の存在を検出する段階を含む。ROR1に関して提示されたヌクレオチド配列(図1)から、任意の数の適したセンスおよびアンチセンスプローブの組み合わせを設計し、この目的に用いることができる。

10

【0087】

また、本発明は、乳癌細胞標本などの他の生物試料の組織中のROR1タンパク質の存在を検出するためのアッセイも提供する。ROR1タンパク質を検出するための方法も周知であり、これには例えば、免疫沈降法、免疫組織化学分析、ウエスタンブロット分析、分子結合アッセイ、ELISA、ELIFAなどが含まれる。例えば、1つの態様において、生物組織中のROR1タンパク質の存在を検出するための方法は、試料をまずROR1抗体、そのROR1反応性断片またはROR1抗体の抗原結合領域を含む組換えタンパク質と接触させる段階、および次にそれに対する試料中のROR1タンパク質の結合を検出する段階を含む。

20

【0088】

本発明のいくつかの態様において、試料中のROR1タンパク質の発現は免疫組織化学染色プロトコールによって検査される。組織切片の免疫組織化学染色は、異種混交的な組織におけるタンパク質の変化を評価するための信頼性のある方法であることが示されている。免疫組織化学(IHC)法はプローブに対する抗体を利用し、一般的には発色法または蛍光法によって細胞抗原をインサイチューで描出する。この技法は、解離による望ましくない影響を回避し、形態学の文脈による個々の細胞の評価を可能にする点で優れている。さらに、標的タンパク質は凍結工程によって変化しない。

30

【0089】

試料中のROR1タンパク質の発現を検査するいくつかの特定のプロトコールは、典型的には、組織試料の調製に続いて免疫組織化学を行うことを含む。例示的なプロトコールを以下に提示する。試料調製のためには、対象からの任意の組織試料を用いてよい。用い得る組織試料の例には、乳房組織が非制限的に含まれる。組織試料は、外科的摘出、吸引または生検を非制限的に含む、さまざまな手順によって入手可能である。組織は新鮮なままでもよく、凍結されていてもよい。1つの態様では、組織試料を固定し、パラフィンなどの中に包埋する。組織試料は従来の方法によって固定(すなわち、保存)することができる(例えば、「Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology」, 3rd edition (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; 「The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology」(1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.を参照されたい)。当業者は、固定剤の選択が、組織学的に染色するか別の様式で分析しようとする組織の目的によって決まることを理解していると考えられる。当業者はまた、固定の長さが、組織試料のサイズおよび用いる固定剤に依存することも理解していると考えられる。例としては、中性緩衝ホルマリン、ブワン液またはパラホルムアルデヒドを、組織試料の固定のために用いることができる。

40

【0090】

50

一般的には、まず組織試料を固定し、続いて比率を徐々に高めたアルコールで脱水し、浸透させた上で、組織試料を切片化し得るようにパラフィンまたは他の切片用媒質中に包埋する。または、組織を切片化し、得られた切片を固定してもよい。一例として、組織試料を従来の方法によって包埋して加工してもよい(例えば、「Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology」, 前記を参照されたい)。用い得るパラフィンの例には、Paraplast、BroloidおよびTissuemayが非制限的に含まれ得る。ひとたび組織試料を包埋すれば、ミクロトームなどを用いて試料を切片化することができる(例えば、「Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology」, 前記を参照されたい)。この目的に関する一例として、切片の厚さは約3ミクロンから約5ミクロンまでの範囲であってよい。ひとたび切片化すれば、いくつかの標準的な方法によって切片をスライドに接着させることができる。スライド接着剤の例には、シラン、ゼラチン、ポリ-L-リジンなどが非制限的に含まれる。一例として、パラフィン包埋切片を、正に荷電したスライドおよび/またはポリ-L-リジンをコーティングしたスライドに接着させてもよい。

10

【0091】

パラフィンを包埋材料として用いた場合には、組織切片を一般に脱パラフィン処理し、水中で再水和させる。組織切片は、いくつかの従来標準的な方法によって脱パラフィン処理することができる。例えば、キシレンおよび段階的に比率を下げたアルコールを用いることができる(例えば、「Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology」, 前記を参照されたい)。または、Hemo-De7(CMS, Houston, Texas)などの市販の非有機性脱パラフィン処理剤を用いることもできる。

20

【0092】

組織調製に続いて、組織切片を免疫組織化学(IHC)に供することができる。IHCを、形態学的染色および/または蛍光インサイチューハイブリダイゼーションなどの別の手法と組み合わせてもよい。IHCには、直接アッセイおよび間接アッセイという2種類の一般的な方法がある。最初のアッセイでは、標的抗原に対する抗体の結合を直接測定する。この直接アッセイには、さらなる抗体相互作用を用いずに可視化し得る、蛍光タグまたは酵素標識した一次抗体などの標識試薬を用いる。典型的な間接アッセイでは、非結合型の一次抗体を抗原に結合させ、続いて標識二次抗体を一次抗体と結合させる。二次抗体が酵素標識と結合している場合には、抗原の可視化を得るために発色性または発蛍光性の基質を添加する。複数の二次抗体が一次抗体上の異なるエピトープと反応し得るため、シグナル増幅が起こる。

30

【0093】

免疫組織化学のために用いられる一次および/または二次抗体は、典型的には、検出可能な部分によって標識されると考えられる。さまざまな標識を利用することができ、これらは一般に以下のカテゴリーにグループ分けすることができる：

(a)³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³Hおよび¹³¹Iなどの放射性同位体。抗体は、例えば「Current Protocols in Immunology」, Volumes 1 and 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs.(1991)に記載された技法を用いて放射性同位体で標識することができ、放射能をシンチレーション計数を用いて測定することができる。

40

(b)コロイド金粒子。

(c)希土類キレート剤(ユーロピウムキレート剤)、テキサスレッド、ローダミン、フルオレセイン、ダンシル、リサミン、ウンベリフェロン、フィコエリトリン、フィコシアニンまたは市販の蛍光団(SPECTRUM ORANGE7およびSPECTRUM GREEN7など)および/または以上のものの任意の1つまたは複数の誘導体を非制限的に含む蛍光標識。蛍光標識は、例えば「Current Protocols in Immunology」, 前記に開示されている技法を用いて、抗体と結合させることができる。蛍光は、蛍光光度計を用いて定量することができる。

(d)さまざまな酵素基質標識が利用可能であり、米国特許第4,275,149号はこれらのうちいくつかの概説を示している。酵素は一般に、さまざまな技法を用いて測定可能な、発色基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素が基質における色調変化を触媒し、それを分光

50

学的に測定してもよい。または、酵素が基質の蛍光または化学発光を改変してもよい。蛍光の変化を定量するための手法については上述している。化学発光性基質は化学反応によって電子的に励起され、その後(例えば化学発光測定装置を用いて)測定可能な光を発する、またはエネルギーを蛍光受容体に供与する。酵素性標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第4,737,456号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ウレアーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖オキシダーゼ(例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環オキシダーゼ(ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。酵素を抗体と結合させるための技法は、O'Sullivan et al., 「Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay」、Methods in Enzym.(ed. J. Langone & H. Van Vunakis)中, Academic press, New York, 73: 147-166(1981)に記載されている。

10

【0094】

酵素-基質の組み合わせの例には、例えば以下のものが含まれる:

(i)西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRPO)と、基質としての水素ペルオキシダーゼ。この場合、水素ペルオキシダーゼは色素前駆体(例えば、オルトフェニレンジアミン(OPD)または塩酸3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB))を酸化する;

(ii)アルカリホスファターゼ(AP)と、発色性基質としてのパラ-ニトロフェニルリン酸

20

;および
(iii) -D-ガラクトシダーゼ(-D-Gal)と、発色性基質(例えば、p-ニトロフェニル-D-ガラクトシダーゼ)または発蛍光性基質(例えば、4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシダーゼ)。

【0095】

当業者は、さまざまな他の酵素-基質の組み合わせを利用することができる。これらの一般的な概説については、米国特許第4,275,149号および第4,318,980号を参照されたい。

【0096】

時には、標識は抗体と間接的に結合される。当業者はこれを実現するためのさまざまな技法を承知していると考えられる。例えば、抗体をビオチンと結合させ、上述した4つの幅広いカテゴリーのいずれかの標識をアビジンと結合させること、またはその逆にすることが可能である。ビオチンはアビジンと選択的に結合するため、標識はこの間接的な様式で抗体と結合することができる。または、標識と抗体との間接的結合を実現するために、抗体を小型ハプテンと結合させ、上述した種々のタイプのうち1つの標識を抗ハプテン抗体と結合させる。このようにして、標識と抗体との間接的結合を実現することができる。

30

【0097】

以上に考察した試料調製手順とは別に、IHCの前、最中または後に、組織切片のさらなる処理が望まれる場合もある。例えば、組織試料をクエン酸緩衝液中で加熱するといったエピトープ回収法を行うこともできる(例えば、Leong et al. Appl Immunohistochem. 4(3):201(1996)を参照されたい)。

40

【0098】

任意でのブロッキング段階の後に、一次抗体が組織試料中の標的タンパク質抗原と結合するように、十分な期間にわたり適した条件下で組織切片を一次抗体に曝露させる。これを実現するために適切な条件は、ルーチン的な実験によって決定し得る。抗体と試料との結合の程度は、以上に考察した検出可能な標識のいずれか1つを用いることによって決定される。好ましくは、標識は、3,3'ジアミノベンジジン発色団などの発色性基質の化学変化を触媒する酵素標識(例えば、HRPO)である。好ましくは、酵素標識は一次抗体と特異的に結合する抗体と結合される(例えば、一次抗体はウサギポリクローナル抗体であり、二次抗体はヤギ抗ウサギ抗体である)。

【0099】

50

このようにして調製された標本をマウントし、カバーガラスで覆うこともできる。続いて、スライドの評価を、例えば顕微鏡を用いて行う。

【0100】

以下のパラメーターに拘束されることはないが、タンパク質の染色強度の基準を、以下のチャートに例示したようにして評価してもよい。

【0101】

タンパク質の染色強度の基準

染色パターン	スコア
腫瘍細胞に染色が全く観察されない。	0
腫瘍細胞にわずかな／辛うじて認知し得る染色が検出される。	1+
腫瘍細胞に弱いないし中等度の完全な染色が観察される。	2+
腫瘍細胞に中等度ないし強い完全な染色が観察される。	3+
腫瘍細胞に強いないし非常に強い完全な染色が観察される。	4+

10

【0102】

ROR1を発現する細胞を同定するための他の方法も、当業者は利用することができる。1つの態様において、ROR1遺伝子が発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞内のROR1 mRNAの存在を検出する段階を含む。細胞内の特定のmRNAを検出するための方法は周知であり、これには例えば、相補的DNAプローブを用いるハイブリダイゼーションアッセイ(標識したROR1リボプローブを用いるインサイチューハイブリダイゼーション、ノーザンブロット法および関連技法など)および種々の核酸増幅アッセイ(ROR1に対して特異的な相補的プライマーを用いるRT-PCR、および例えば分枝DNA、SISBA、TMAなどを用いる他の増幅型検出法)が含まれる。または、ROR1遺伝子が発現する細胞を同定するためのアッセイは、細胞内の、または細胞によって分泌されるROR1タンパク質の存在を検出する段階を含む。タンパク質を検出するためのさまざまな方法が当技術分野で周知であり、ROR1タンパク質およびROR1発現細胞の検出に用いることができる。

20

【0103】

ROR1発現解析も、ROR1遺伝子の発現を調節する作用因子の同定および評価のためのツールとして有用と思われる。例えば、ROR1の発現は乳癌で著しくアップレギュレートされており、他の癌でも異常に発現される。癌細胞におけるROR1の発現または過剰発現を抑制し得る分子または生物学的因子の同定には治療的意義がある可能性がある。このような因子は、RT-PCR、核酸ハイブリダイゼーションまたは抗体結合によってROR1発現を定量化するスクリーニングを用いることによって同定し得る。

30

【0104】

ROR1およびその産物の状態のモニタリング

個体におけるROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物の状態を評価するアッセイは、この個体からの生物試料の増殖または発癌能力に関する情報を与えると思われる。例えば、ROR1 mRNAは正常乳房組織と比べて特定の乳癌細胞で非常に高度に発現されるため、生物試料におけるROR1 mRNA転写物またはタンパク質の相対レベルを評価するアッセイは、ROR1調節障害と関連性のある癌などの疾患を診断するために用いることができ、例えば適切な治療選択肢を明確にするために有用となり得る予後予測情報を与える可能性がある。同様に、生物試料におけるROR1ヌクレオチドおよびアミノ酸配列の完全性を評価するアッセイをこの文脈で用いることもできる。

40

【0105】

ROR1 mRNAが特定の乳癌サブタイプで非常に高度に発現されるという知見は、この遺伝子が調節障害性細胞増殖と関連しているという証拠を与え、これにより、この遺伝子およびその産物を、ROR1調節障害と関連性のある疾患を有することが疑われる個体からの生物試料を評価するために用い得る標的として特定している。この文脈において、ROR1遺伝子

50

およびその産物の状態の評価は、組織試料の罹患可能性に関する情報を得るために用いることができる。

【0106】

この文脈における「状態(status)」という用語は、当技術分野で認められているその意味に従って用いられ、遺伝子(その調節配列を含む)の完全性および/またはメチル化、発現される遺伝子産物の位置(ROR1発現細胞の位置を含む)、発現される遺伝子産物(ROR1 mRNAポリヌクレオチドおよびポリペプチドなど)の存在、レベルおよび生物活性、発現される遺伝子産物に対する転写修飾および翻訳修飾の存在または欠如、ならびに発現される遺伝子産物とタンパク質結合パートナーといった他の生物分子との会合を非制限的に含む、遺伝子およびその産物の状態のことを指す。ROR1の状態の変化は、典型的には以下に考察するもののような、当技術分野で周知の多種多様な方法によって評価することができる。典型的には、ROR1の状態の変化には、ROR1発現細胞の位置の変化、ROR1 mRNAおよび/もしくはタンパク質の発現の増大、ならびに/またはROR1と結合パートナーとの会合または解離が含まれる。

10

【0107】

ROR1の発現プロファイルは、これを局所性および/または転移性乳癌に対する見込みのある診断マーカーとしている。特に、ROR1遺伝子産物の状態は、進行期疾患に対する感受性、進行の速度、および/または腫瘍の悪性度を含む、さまざまな因子を予測するために有用な情報を与える可能性がある。本発明は、ROR1の状態の判定およびROR1を発現する癌、例えば乳癌などの診断のための方法およびアッセイを提供する。患者試料におけるROR1の状態は、免疫組織化学分析、インサイチュウハイブリダイゼーション、レーザーマイクロダイセクションを行った試料に対するRT-PCR分析、臨床試料および細胞系のウエスタンブロット分析、ならびに組織アレイ分析を含む、当技術分野で周知のさまざまな手段によって分析することができる。ROR1遺伝子および遺伝子産物の状態を評価するための典型的なプロトコールは、例えば、Ausubul et al. eds., 1995, 「Current Protocols In Molecular Biology」, Units 2 [Northern Blotting]、4 [Southern Blotting]、15 [Immunoblotting] および18 [PCR Analysis] に記載がある。

20

【0108】

上記のように、生物試料におけるROR1の状態は、当技術分野で周知のさまざまな手順によって検査される。例えば、体内の特定の位置から採取した生物試料におけるROR1の状態は、試料をROR1発現細胞(例えば、ROR1 mRNAまたはタンパク質を発現するもの)の存在または欠如に関して評価することによって検査し得る。この検査は、例えば、ROR1を発現する乳房細胞が、そのような細胞を通常は含まない生物試料(リンパ節、骨または脾臓など)中に認められる場合に、調節障害性細胞増殖の証拠を与えることができる。生物試料におけるROR1の状態のこのような変化は、調節障害性細胞増殖をしばしば伴う。具体的には、調節障害性細胞増殖の1つの指標は、起源臓器(乳腺など)から体内の異なる場所(リンパ節など)への癌細胞の転移である。この文脈において、調節障害性細胞増殖の証拠は、例えば、潜在性リンパ節転移を乳癌の患者のかなりの割合で検出することができ、このような転移は疾患進行の既知の予測因子と関連性があることから、重要である(例えば、Gipponi et al., J Surg Oncol. 2004 Mar 1;85(3): 102-111を参照されたい)。

30

40

【0109】

1つの局面において、本発明は、調節障害性細胞増殖を伴う疾患(過形成または癌)を有することが疑われる個体からの被験組織試料中の細胞によって発現されるROR1遺伝子産物の状態を判定すること、および続いて、そのようにして判定された状態に対応する正常試料におけるROR1遺伝子産物の状態と比較することによる、ROR1遺伝子産物のモニタリングのための方法であって、正常試料と対比して被験試料中に異常なROR1遺伝子産物が存在することによって個体の細胞内部の調節障害性細胞増殖の存在が示される方法を提供する。

【0110】

もう1つの局面において、本発明は、被験細胞または被験試料におけるROR1 mRNAまたはタンパク質発現の有意な増加を、対応する正常細胞または組織における発現レベルと対比

50

して検出することを含む、個体における癌の存在の判定に有用なアッセイを提供する。ROR1 mRNAの存在は、例えば、基底状およびBRCA1乳癌サブタイプなどの乳癌サブタイプを非制限的に含む、組織試料において評価することができる(例えば、Sorlie et al., PNAS(2001), 98(19): 10869-10874を参照されたい)。対応する正常組織はROR1 mRNAを発現しな

【0111】

1つの関連した態様では、ROR1の発現状態を核酸レベルではなくタンパク質レベルで判定してもよい。例えば、このような方法またはアッセイは、被験組織試料中の細胞によって発現されるROR1タンパク質のレベルを判定すること、およびこのようにして判定されたレベルを対応する正常試料中で発現されるROR1のレベルと比較することを含むと考えられる。1つの態様では、ROR1タンパク質の存在を、例えば免疫組織化学的な方法を用いて評価する。ROR1タンパク質の発現を検出し得るROR1抗体または結合パートナーは、この目的のために当技術分野で周知のさまざまなアッセイ形式に用いることができる。

【0112】

また別の関連した態様において、生物試料におけるROR1ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を、挿入、欠失、置換といったこれらの分子の構造における擾乱を同定する目的で評価することができる。このような態様は、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における擾乱は成長調節不全表現型と関連性のある多数のタンパク質で観察されるため、有用である(例えば、Marrogi et al., 1999, J. Cutan. Pathol. 26(8): 369-378を参照されたい)。この文脈において、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における擾乱を観察するための多種多様なアッセイが当技術分野で周知である。例えば、ROR1遺伝子産物の核酸配列またはアミノ酸配列のサイズおよび構造は、本明細書で考察しているノーザン法、サザン法、ウエスタン法、PCRおよびDNAシーケンシングのプロトコールによって観察することができる。さらに、一本鎖高次構造多型分析などの、ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列における擾乱を観察するための他の方法が当技術分野で周知である(例えば、米国特許第5,382,510号および第5,952,170号を参照されたい)。

【0113】

もう1つの態様において、生物試料におけるROR1遺伝子のメチル化の状態を検査することができる。不死化細胞および形質転換細胞では、遺伝子の5'調節領域におけるCpG島の異常な脱メチル化および/または過剰メチル化が高頻度に起こっており、これはさまざまな遺伝子の発現変化をもたらし得る。例えば、pikラスのグルタチオンS-トランスフェラーゼ(正常前立腺では発現されるが前立腺癌の90%超では発現されないタンパク質)のプロモーター過剰メチル化はこの遺伝子の転写の永続的なサイレンシングを起こすように思われ、これは前立腺癌で最も高頻度に検出されるゲノム変化である(De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992(1999))。さらに、この変化は高グレード前立腺上皮内腫瘍(PIN)の症例の少なくとも70%に存在する(Brooks et al, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7: 531-536)。もう1つの例として、LAGE-1腫瘍特異的遺伝子(これは正常前立腺では発現されないが前立腺癌の25~50%で発現される)の発現はリンパ芽球細胞でデオキシアザシチジンによって誘導され、これは腫瘍性発現が脱メチル化に起因することを示唆する(Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908(1998))。この文脈においては、遺伝子のメチル化の状態を検査するためのさまざまなアッセイが当技術分野で周知である。例えば、サザンハイブリダイゼーションアプローチにおいて、CpG島の全体的なメチル化状態を評価するために、メチル化されたCpG島を含む切断を切除することができないメチル化感受性制限酵素を利用することができる。さらに、MSP(メチル化特異的PCR)は、所定の遺伝子のCpG島に存在するすべてのCpG部位のメチル化状態を容易にプロファイル化することができる。この手順は、まず亜硫酸水素ナトリウム(すべての非メチル化シトシンをウラシルに変換すると考えられる)によってDNAを修飾し、続いて非メチル化DNAとの対比でメチル化に対して特異的なプライマーを用いる増幅を行うことを含む。メチル化干渉を含むプロトコールも、例えば「Current Protocols In Molecular Biology」, Un

10

20

30

40

50

it 12, Frederick M. Ausubul et al. eds., 1995に記載されている。

【0114】

遺伝子増幅は、1p31にマッピングされている座位であり、種々の癌において擾乱を来していることが示されている領域である、ROR1の状態を評価するためのさらなる方法を提供する。遺伝子増幅は本明細書に提示した配列に基づき、適切に標識されたプローブを用いて、例えば、従来のサザンプロット法、mRNAの転写を定量するためのノーザンプロット法(Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205)、ドットプロット法(DNA分析)またはインサイチュハイブリダイゼーションによって試料中で直接測定することもできる。または、DNA二重鎖、RNA二重鎖およびDNA-RNAハイブリッド二重鎖またはDNA-タンパク質二重鎖を含む、特定の二重鎖を認識し得る抗体を用いることもできる。抗体を

10

【0115】

以上に考察した組織に加えて、末梢血を、例えば、ROR1の発現を検出するためのノーザン分析またはRT-PCR分析を用いて、乳癌を非制限的に含む癌細胞の存在に関して首尾良くアッセイすることもできる。RT-PCRで増幅可能なROR1 mRNAの存在は、これらの種類の癌の存在を示す指標を与える。末梢血中の腫瘍細胞に関するRT-PCR検出アッセイは現在、数多くのヒト固形腫瘍の診断および管理における使用に関して評価が進められている。

【0116】

本発明の1つの関連した局面は、個体における癌の発症に対する感受性を予測することに向けられる。1つの態様において、癌に対する感受性を予測するための方法は、その存在によって癌に対する感受性が示され、存在するROR1 mRNA発現の程度が感受性の程度と比例するような、組織試料中のROR1 mRNAまたはROR1タンパク質を検出する段階を含む。1つの具体的な態様では、乳房組織におけるROR1の存在を検査し、試料中にROR1が存在することによって乳癌感受性(または乳房腫瘍の出現もしくは存在および/または特定の乳房腫瘍サブタイプの出現もしくは存在)の指標が得られる。もう1つの具体的な態様では、組織におけるROR1の存在を検査し、試料中にROR1が存在することによって癌感受性(または腫瘍の出現もしくは存在)の指標が得られる。1つの密接に関連した態様において、生物試料におけるROR1ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を、挿入、欠失、置換といったこれらの分子の構造における擾乱を同定する目的で評価することができ、試料中のROR1

20

30

【0117】

本発明のもう1つの関連した局面は、腫瘍の悪性度を評価するための方法に向けられる。1つの態様において、腫瘍の悪性度を評価するための方法は、腫瘍の試料中の細胞により発現されるROR1 mRNAまたはROR1タンパク質のレベルを測定する段階、そのようにして測定されたレベルを同じ個体から採取した対応する正常組織または正常組織対照標本で発現されるROR1 mRNAまたはROR1タンパク質のレベルと比較する段階を含み、正常試料と対比した腫瘍試料におけるROR1 mRNAまたはROR1タンパク質の発現の度合いによって悪性度の度合いが示される。1つの具体的な態様において、腫瘍の悪性度は腫瘍細胞においてROR1

40

【0118】

本発明のさらにもう1つの関連した局面は、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法に向けられる。1つの態様において、個体における悪性腫瘍の進行を経時的に観察するための方法は、腫瘍の試料中の細胞によって発現されるROR1 mRNAまたはROR1

50

タンパク質のレベルを同じ個体から異なる時点で採取した同等な組織試料で発現されるレベルと比較する段階を含み、腫瘍試料におけるROR1 mRNAまたはROR1タンパク質発現の経時的な度合いによって癌の進行に関する情報が得られる。1つの具体的な態様において、癌の進行は、腫瘍細胞におけるROR1発現が変化する程度を経時的に決定することによって評価され、発現レベルが高いことによって癌の進行が示される。1つの密接に関連した態様において、生物試料におけるROR1ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の完全性を、挿入、欠失、置換といったこれらの分子の構造における擾乱を同定する目的で評価することができ、1つまたは複数の擾乱が存在することによって癌の進行が示される。

【0119】

以上の診断アプローチは、当技術分野で公知のさまざまな予後予測プロトコールおよび診断プロトコールのいずれかと組み合わせることができる。例えば、本明細書に開示する本発明のもう1つの態様は、組織試料の状態の診断および予後予測のための手段として、ROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物の発現(またはROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物における擾乱)と悪性腫瘍と関連性のある因子との間の一致を観察するための方法に向けられる。この文脈においては、悪性腫瘍と他の様式で関連性のある遺伝子の発現(Her-2ならびにBRCA1および2の発現)ならびに巨視的な細胞学的観察所見といった多種多様な因子を利用することができる(例えば、Bocking et al, 1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2): 74-88; Eptsein, 1995, Hum. Pathol 26(2): 223-9; Thorson et al, 1998, Mod. Pathol. 11(6): 543-51; Baisden et al., 1999, Am. J. Surg. Pathol. 23(8): 918-24を参照されたい)。ROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物の発現(またはROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物における擾乱)と悪性腫瘍と関連性のある別の因子との間の一致を観察するための方法は、例えば、一致する特定の因子のセットまたは一群の存在により、組織試料の状態の診断および予後予測のために極めて重要な情報が得られることから、有用である。

【0120】

1つの典型的な態様において、ROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物の発現(またはROR1遺伝子およびROR1遺伝子産物における擾乱)と悪性腫瘍と関連性のある因子との間の一致を観察するための方法は、組織試料におけるROR1 mRNAまたはタンパク質の過剰発現を検出する段階、組織試料におけるBRCA1または2のmRNAまたはタンパク質の過剰発現を検出する段階、およびROR1 mRNAまたはタンパク質とBRCA mRNAまたはタンパク質との過剰発現の一致を観察する段階を伴う。もう1つの具体的な態様では、乳房組織におけるROR1およびHer-2 mRNAの発現を検査する。1つの一般的な態様では、試料におけるROR1およびHer-2またはBRCA1もしくは2のmRNAの過剰発現により、乳癌、乳癌サブタイプ、乳癌感受性または乳房腫瘍の出現もしくは存在の指標が得られる。

【0121】

ROR1 mRNAまたはタンパク質の発現を検出または定量化するための方法は本明細書に記載されており、標準的な核酸およびタンパク質の検出および定量化の手法は当技術分野で周知である。ROR1 mRNAの検出および定量化のための標準的な方法には、標識したROR1リボプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーション、ROR1ポリヌクレオチドプローブを用いるノーザンブロット法および関連技法、ROR1に対して特異的なプライマーを用いるRT-PCR解析、ならびに例えば分枝DNA、SISBA、TMAなどを用いる他の増幅型検出方法が含まれる。1つの具体的な態様では、以下の実施例で述べるようにRT-PCRを用いてROR1 mRNA発現の検出および定量化を行う。この目的にはROR1を増幅し得る任意の数のプライマーを用い得る。この目的にはタンパク質の検出および定量化のための標準的な方法を用いることができる。1つの具体的な態様では、野生型ROR1タンパク質と特異的に反応するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を生検組織の免疫組織化学アッセイに用いる。

【0122】

本発明には数多くの態様がある。1つの態様は、SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチドをコードするオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチドの生物試料におけるレベルを評価することによって、ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標

10

20

30

40

50

となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、被験試料におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが正常乳房組織試料と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られ、細胞におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物とハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験生物試料中のROR1ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価することによって評価される方法である。

【0123】

1つの関連した態様は、SEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチドをコードするオープン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチドのヒト乳房細胞におけるレベルを評価することによって、ヒト乳房細胞を乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリヌクレオチド(例えば、mRNAおよびゲノム配列)のレベルが正常ヒト乳房細胞と比較して高いことによって乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠が得られ、乳癌に伴うまたは乳癌の証拠を与える細胞増殖変化の証拠が検査されるように、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルが、ヒト乳房細胞内の内因性ROR1ポリヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列と特異的にハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチド(例えば、検出マーカーで標識されたプローブまたはPCRプライマー)と接触させ、ROR1相補的ポリヌクレオチドと試料中のROR1ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価すること(例えば、ノーザン分析またはPCRにより)によって評価される方法である。本発明のいくつかの特定の態様は、被験生物試料におけるHer-2(SEQ ID NO: 3)、EGFR(SEQ ID NO: 4)、VEGF(SEQ ID NO: 5)、FMS様チロシンキナーゼ(SEQ ID NO: 6)、MYC(SEQ ID NO: 7)、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター(SEQ ID NO: 8)、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(SEQ ID NO: 9)、BRCA1(SEQ ID NO: 10)またはBRCA2(SEQ ID NO: 11)ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドの発現および/または配列を検査する段階をさらに含む。

【0124】

本発明のいくつかの態様において、細胞増殖変化の証拠を与える、正常ヒト乳房細胞と比較したヒト乳房細胞におけるROR1ポリヌクレオチドの増加は、例えば、ROR1ポリヌクレオチドの相対レベルの少なくとも100%(1倍)の増加、または200%(2倍)、4倍、8倍、15倍、30倍、60倍もしくは120倍の増加として定量される。本明細書に開示した定量的mRNA分析において(例えば、図5を参照されたい)、被験細胞におけるROR1 mRNAのレベルの増加は、15倍の増加(例えばBT-20細胞株で)からHCC1187細胞株における120倍の増加までの範囲にわたった。管腔性乳癌細胞株で観察された発現と比較して、過剰発現性細胞株におけるROR1ポリヌクレオチドのレベルの平均増加幅は43倍である。ROR1発現の比較参照として用い得る標準化された基準は、例えば、同じ個体から採取した正常乳房組織または健康な個体から採取した正常組織参照試料から入手することができる。または、標準化された基準は、個体集団からの正常細胞の統計学的サンプリングによって得られる正常なROR1発現の数値範囲であってもよい。本発明のいくつかの特定の態様において、標準化された基準は、ROR1の発現を、同じ細胞環境で比較的安定なレベルで発現される対照遺伝子(例えば、アクチンなどのハウスキーピング遺伝子)と比較することによって得られる。

【0125】

不死化した非悪性乳房細胞株は基底由来であるように思われ、これも同じくROR1ポリヌクレオチドを管腔性乳癌細胞よりも有意に高いレベルで発現する。この文脈において、ROR1ポリヌクレオチド発現のレベルは非悪性基底細胞と比べて基底状乳癌細胞の方が高いことが観察されており、ROR1ポリヌクレオチド発現の平均増加幅は7倍の増加である。連続的に増殖する非悪性管腔細胞は得られていないが、本明細書に記載した管腔性乳癌および正常組織の分析からは正常管腔乳癌細胞におけるROR1ポリヌクレオチドの発現は極めて低いか検出不能であることが示唆されている。原発性乳癌におけるROR1発現を乳房細胞系と比較し、対数比として算出すると、ROR1を最も高度に発現する12種の細胞株の平均対数比

は0.40である(0.12から0.9までの範囲)。5件の基底状ROR1陽性原発性乳癌の平均対数比は0.26である(0.21から0.32までの範囲)。これらの計算の一貫性は、同じ参照(純粋な腫瘍細胞株)と比較した場合に、乳房腫瘍のROR1発現レベルが純粋な細胞株で観察されるものと同程度であるが幾分低いという観察所見によって裏付けられる。特定の理論に拘束されるわけではないが、原発性腫瘍における腫瘍細胞は複数の細胞種(ROR1を発現しないことが公知であるものを含む)の複合的混合物として存在するため、これらの観察所見は単純な希釈効果と一致する。

【0126】

本発明のいくつかの特定の態様において、乳癌は基底状サブタイプのものである。当技術分野で公知であるように、乳癌は、基底状サブタイプを含む数多くの異なるサブタイプにグループ分けされる(例えば、Sorlie et al., PNAS(2001), 98(19): 10869-10874を参照されたい)。詳細には、乳管は、基底膜に付着する管腔層および筋上皮層から構成される二層構造である。基底状サブタイプという用語は、当技術分野で認められている用語であり、重層上皮の基底層から生じる特定の癌のことを指す(例えば、Wilson et al. Breast Cancer Research Vol 6 No. 5: 192-200(2004)中の図1を参照されたい)。基底状サブタイプの乳癌は、頂端層または管腔層とは異なり、乳房の導管上皮の基底層に位置する。このような癌は、皮膚の基底細胞で最初に見いだされた中間フィラメント性プロファイル(サイトケラチン)などの際立った細胞学的特徴および遺伝子発現プロファイルを有する。特に、皮膚の基底細胞は、単層上皮または腺上皮で認められるK8、K18、K19とは異なり、複合上皮で認められるいくつかの特定のサイトケラチン(すなわち、K5/6、K7、K17、K14)を発現することが公知である。

【0127】

乳癌のサブタイプ(例えば、基底細胞特性を有するものは、本明細書に開示する病理学-IHCデータおよび/またはStanford乳房腫瘍プロファイリングデータによって容易に判定することができる。例えば、Wetzels et al, Am J Pathol.(1991)138: p751-63(これは参照として本明細書に組み入れられる)は、ヒト乳癌における基底細胞特異的で過剰増殖関連性のケラチンを記載している。この研究では、浸潤性乳癌の15%(n=115)が基底性サイトケラチン14および17に関して陽性であることが見いだされた。さらに、Bartek et al., Int J. Cancer(1985)36: 299-306(これは参照として本明細書に組み入れられる)も、ヒト乳房組織および腫瘍におけるK19の発現パターンを用いた乳癌サブタイプの特徴付けについて教示している。その反対に、ほとんどの髄様および低分化型の乳管癌はサイトケラチン19に関して陰性であり、中等度分化型および高分化型の乳管癌、浸潤性小葉癌、管状癌および大部分の粘液癌はK19 Absの両方に関して陽性であった。さらに、P-カドヘリン(CD H3)(SEQ ID NO: 12)およびデスモソーム性カドヘリンは乳管の基底層で発現され、P-カドヘリンmRNAは基底状サブタイプおよびBRCA1サブタイプで過剰発現される。このことは、第4群およびBRCA1腫瘍群が、起源細胞種と関連性のある多くの分子特性を共通に有することを裏付ける証拠を提供する。

【0128】

Paredes et al., Pathol. Res. Pract. 2002: 198(12): 795-801(これは参照として本明細書に組み入れられる)も、複数の乳癌サブタイプにおけるPカドヘリンの発現を調べ、それをエストロゲン受容体(ER)の状態と関連付けている。73件の非浸潤性乳管癌(D CIS)および149件の浸潤性乳癌が選択され、Pカドヘリンならびに他の生体マーカーの発現に関して検討された。両タイプの乳癌(非浸潤性および浸潤性)ともに、P-カドヘリン発現はエストロゲン受容体(ER)発現と強い逆相関を示した。P-カドヘリン陽性およびER陰性の腫瘍は、より高い組織学的グレード、高い増殖速度およびc-erbB-2の発現と関連付けられた。このことは、P-カドヘリンがER発現を伴わない乳癌のサブグループを特定すること、ならびにより高い増殖速度および高悪性度挙動の他の予測因子と相関することを示している。Gamallo et al., Mod. Pathol. 2001: 14(7): 650-4; Kovacs et al., J Clin Pathol 2003 Feb; 56(2): 139-41; およびPeralta et al., Cancer 1999 Oct 1; 86(7): 1263-72(これらは参照として本明細書に組み入れられる)も参照されたい。

【0129】

本発明のいくつかの特定の態様において、乳癌はBRCA1サブタイプのものである。詳細には、当技術分野で公知であるように、乳房の癌は、BRCA1サブタイプを含む数多くの異なるサブタイプにグループ分けすることができる(例えば、Sorlie et al., PNAS(2001), 98(19): 10869-10874を参照されたい)。この文脈において、BRCA1サブタイプの乳癌は、BRCA1遺伝子に変異を有することを特徴とする。さまざまな異なるBRCA1変異が多数の組織で起こることが公知であり、これには置換、欠失およびミスセンス変異が含まれる(例えば、Wagner et al., Int J Cancer. 1998 Jul 29; 77(3): 354-60; Chang et al., Breast Cancer Res Treat. 2001 Sep; 69(2): 101-13; およびFoulkes et al., Cancer Res. 2004 Feb 1; 64(3): 830-5; およびAghmesheh et al., Gynecol Oncol. 2005 Apr; 97(1): 16-25を参照されたい。これらは参照として本明細書に組み入れられる)。基底状癌およびBRCA1癌は細胞起源および分子的病因によって関連付けられ、ROR1の過剰発現はこれらの2つの腫瘍群の病因にかかわる重要な変化である。

【0130】

図5Fおよび図5Gは、SKBR細胞を比較用細胞株として用いて、抗ROR1ウサギポリクローナル血清を用いたCAL51細胞表面での内因性ROR1タンパク質の検出を示している。例えば図5Bに示されたROR1 mRNA発現データと比較した場合、抗ROR1ウサギポリクローナル血清を用いたこれらの検討は、ROR1 mRNA発現レベルがROR1タンパク質発現レベルと相関することを示している。これらの図に提示されたmRNA/タンパク質発現の相関データは、ROR1 mRNAおよびタンパク質の発現に関する他の観察所見と一致する。例えば、Paganoniらは、J. Neurosci Res 73: 429-440(2003)(これは参照として本明細書に組み入れられる)において、ROR1を発現するさまざまな細胞で、インサイチュハイブリダイゼーションおよび/またはPCR分析によって調べたROR1 mRNA発現の観察所見が、免疫組織化学および/またはウエスタン分析によって調べたROR1タンパク質発現の観察所見と相関することを教示している。さらに、Paganoniらは、Glia 46: 456-466(2004)(これは参照として本明細書に組み入れられる)において、脳発生の初期にROR1およびROR2 mRNAおよびROR1およびROR2タンパク質の両方がインビボで発現されることを教示している。このGLIAの論文で、Paganoniらはさらに、ある種の培養細胞では、ROR1およびROR2 mRNAだけでなくRORタンパク質も高度に発現されることも教示している。ROR1 mRNAの発現レベルがROR1タンパク質の発現レベルと相関するという観察所見は、ROR1を過剰発現する乳癌細胞は例えば特定の基底状表現型を示し、ROR1を過剰発現しない細胞と比べて予後不良であるという本明細書に提示したデータによってもさらに裏付けられる(翻訳されたタンパク質の機能によって影響されることが当技術分野で公知である特徴)。

【0131】

本発明のもう1つの態様は、ヒト乳房細胞を含む被験生物試料を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示された配列を有するオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリペプチドの生物試料におけるレベルを評価する段階であって、被験試料におけるROR1ポリペプチドのレベルが正常乳房組織試料と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られる段階を含み、細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが試料をSEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体と接触させること、および抗体と試料中のROR1ポリペプチドとの結合によって形成される複合体の存在を評価することによって評価される方法である。

【0132】

本発明の1つの関連した態様は、癌性であることが疑われるヒト乳房細胞(例えば、生検試料からの)を乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠に関して検査する方法であって、SEQ ID NO: 2に示された配列を有するオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリペプチドの乳房細胞におけるレベルを評価する段階であって、ヒト乳房細胞におけるROR1ポリペプチドのレベルが正常乳房細胞(例えば、ヒト乳房細胞を得た個体からの正常細胞)と比較して高いことによって乳癌の指標となる細胞増殖変化の証拠が得られる段階を含み、細胞

におけるROR1ポリペプチドのレベルが、試料をSEQ ID NO: 2に示されたROR1ポリペプチド配列と免疫特異的に結合する抗体(例えば、検出マーカーで標識されたもの)と接触させること、および抗体と試料中のROR1ポリペプチドとの結合によって形成される複合体の存在を評価することによって評価される方法である。典型的には、複合体の存在は、ELISA分析、ウエスタン分析および免疫組織化学からなる群より選択される方法によって評価される。任意で、乳癌は基底状サブタイプまたはBRCA1サブタイプである。

【0133】

本発明のさらにもう1つの態様は、被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化(例えば、欠失、挿入、置換またはミスセンス変異)を同定するために、正常細胞における第1番染色体のバンドp31からのオーファン受容体チロシンキナーゼ(ROR1)ポリヌクレオチド配列を被験ヒト細胞における第1番染色体のバンドp31からのROR1ポリヌクレオチド配列と比較することにより、被験ヒト細胞をヒト癌の指標となる染色体異常の証拠に関して検査する方法であって、被験ヒト細胞におけるROR1ポリヌクレオチド配列の増幅または変化によってヒト癌の指標となる染色体異常の証拠が得られる方法である。このような方法において、被験ヒト細胞における第1番染色体、バンドp31は、典型的には、被験ヒト細胞試料中のROR1ポリヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ヌクレオチド配列またはその相補物と特異的にハイブリダイズするROR1相補的ポリヌクレオチドと接触させること、およびROR1相補的ポリヌクレオチドと被験ヒト細胞内のROR1ポリヌクレオチド配列とのハイブリダイゼーションによって形成されるハイブリダイゼーション複合体の存在を評価すること(例えば、ノーザン分析、サザン分析またはポリメラーゼ連鎖反応分析により)によって評価される。

【0134】

ROR1と相互作用する分子の同定

本明細書に開示するROR1タンパク質配列は、当業者が、それらと相互作用する分子を、当技術分野で認められている種々のプロトコルのいずれかによって同定することを可能にする。例えば、種々のいわゆる相互作用捕捉システム(「ツーハイブリッドアッセイ」とも呼ばれる)のいずれかを利用することができる。このようなシステムでは、相互作用する分子が転写因子を再構成してレポーター遺伝子の発現を導き、その後その発現がアッセイされる。典型的なシステムは真核生物転写アクチベーターの再構成によってインピボでのタンパク質-タンパク質相互作用を同定し、これらは例えば米国特許第5,955,280号、第5,925,523号、第5,846,722号および第6,004,746号に開示されている。

【0135】

または、ROR1タンパク質配列と相互作用する分子をペプチドライブラリーのスクリーニングによって同定することもできる。このような方法では、ROR1などの選択された受容体分子と結合するペプチドを、アミノ酸のランダムまたは管理された集成物をコードするライブラリーをスクリーニングすることによって同定する。ライブラリーによってコードされるペプチドをバクテリオファージコートタンパク質の融合タンパク質として発現させ、続いてバクテリオファージ粒子を関心対象の受容体に対してスクリーニングする。予想されるリガンドまたは受容体分子の構造に関する事前の情報が全くなくても、このようにして、治療用または診断用試薬といった多岐にわたる用途を有するペプチドを同定することができる。ROR1タンパク質配列と相互作用する分子を同定するために用い得る典型的なペプチドライブラリーおよびスクリーニング方法は、例えば、米国特許第5,723,286号および第5,733,731号に開示されている。

【0136】

または、ROR1を発現する細胞系を、ROR1によって媒介されるタンパク質-タンパク質相互作用の同定のために用いることもできる。この可能性は、他の者によって示されているように免疫沈降法を用いて検討することができる(Hamilton, B.J., et al., 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 261: 646-51)。典型的には、ROR1タンパク質を、ROR1を発現する乳癌細胞株から、抗ROR1抗体を用いて免疫沈降させることができる。または、Hisタグに対する抗体を、ROR1を発現するように操作された細胞系(上述のベクター)に用いるこ

10

20

30

40

50

ともできる。免疫沈降複合体は、ウエスタンブロット法、タンパク質の³⁵S-メチオニン標識、タンパク質マイクロシーケンシング、銀染色および二次元ゲル電気泳動などの手順により、タンパク質会合に関して検査することができる。

【0137】

このようなスクリーニングアッセイの関連した態様には、ROR1と相互作用する低分子を同定するための方法が含まれる。典型的な方法は、例えば米国特許第5,928,868号で考察されており、これには少なくとも1つのリガンドが低分子であるハイブリッドリガンドを形成させるための方法が含まれる。1つの例示的な態様において、第1および第2の発現ベクターを入れ替わりに含む細胞にハイブリッドリガンドを導入する。それぞれの発現ベクターは、標的タンパク質と転写モジュールのコード配列が結合したものをコードするハイブリッドタンパク質を発現させるためのDNAを含む。細胞はさらにレポーター遺伝子を含み、その発現は第1および第2のハイブリッドタンパク質が互いに近接していることを必要条件とするが、これはハイブリッドリガンドが両方のハイブリッドタンパク質上の標的部位と結合した場合にのみ起こる事象である。レポーター遺伝子を発現する細胞を選択し、未知の低分子または未知のハイブリッドタンパク質を同定する。

10

【0138】

本発明の1つの典型的な態様は、図1に示されたROR1アミノ酸配列と相互作用する分子に関するスクリーニングの方法であって、分子の集団をROR1アミノ酸配列と接触させる段階、分子の集団およびROR1アミノ酸配列を相互作用を促進する条件下で相互作用させる段階、ROR1アミノ酸配列と相互作用する分子の存在を判定する段階、ならびに続いてROR1アミノ酸配列と相互作用しない分子をROR1アミノ酸配列と相互作用する分子から分離する段階を含む方法からなる。1つの具体的な態様において、本方法はさらに、ROR1アミノ酸配列と相互作用する分子を精製する段階を含む。1つの態様において、ROR1アミノ酸配列をペプチドのライブラリーと接触させる。

20

【0139】

治療的方法および組成物

乳癌のサブタイプにおいて(および可能性としては他の癌でも)高度に発現される遺伝子としてのROR1の同定は、このような癌の治療に対して数多くの新たな治療アプローチを切り開く。以上に考察したように、ROR1は癌細胞から分泌され、このようにして増殖シグナルを調節している可能性がある。その転写因子としての役割の可能性およびそれが乳癌で高度に発現されることから、これは低分子を介した治療法の標的となる可能性がある。

30

【0140】

このため、ROR1タンパク質の活性の阻害を目指した治療アプローチは、乳癌およびROR1を発現する他の癌に罹患した患者に対して有用であると期待される。

【0141】

抗体を用いる治療法の標的としてのROR1

本明細書に開示したように、ROR1は、乳癌などのある種の病態において過剰発現される細胞表面タンパク質である。ROR1の構造的特徴は、この分子が抗体を用いる治療戦略の魅力的な標的であることを示している。ROR1はさまざまな系譜の癌細胞によって発現され、対応する正常細胞によっては発現されないため、ROR1免疫反応性組成物の全身投与は、免疫治療用分子と標的でない臓器および組織との結合によって引き起こされる有毒な、非特異的および/または非標的性の影響を伴わずに、優れた感受性を示すと期待される。ROR1のドメインと特異的に反応する抗体は、毒素もしくは治療薬との結合物として、または細胞の増殖または機能を阻害し得る裸の抗体として、ROR1を発現する癌を全身性に治療するために有用な可能性がある。

40

【0142】

当技術分野で公知であるように、細胞表面タンパク質に対する抗体は、これらの細胞表面タンパク質を発現する細胞を選好的に死滅させる治療方法に用いることができ、特に細胞表面タンパク質(例えば、HER2)が、患者の体内で正常細胞と比較して病的細胞で過剰発現されるような状況ではそうである。このような抗体を用いる周知の方法は、有効量の抗

50

体を投与された患者において、このような抗体が補体カスケードを活性化する、および/または抗体依存性細胞傷害を媒介する能力を利用している。代替的な方法には、細胞毒性部分とこれらの抗体の1つとの結合物であるイムノトキシンの使用が含まれる。抗ROR1抗体が任意の被験細胞の増殖を阻害する能力を評価するために必要な実験の量は少なく、当技術分野で十分に確立されたプロトコールに従う。さらに、抗体が、その抗体によって認識され、ROR1の特定のな特徴を有する(例えば、HER2などのタンパク質と類似した発現パターンおよび構造などを有する)タンパク質を表面に発現する細胞を死滅させる能力は、十分に確立された科学的原理に従う。その結果、ROR1抗体が任意の細胞種の増殖を阻害する、および/またはそれを死滅させる能力は、最小限の実験を用いて決定することができる。

10

【0143】

抗体がROR1と結合して、受容体およびfrizzledファミリーのリガンドとの相互作用といった機能を変化または擾乱させ、その結果、細胞および腫瘍の破壊を媒介する、および/または細胞もしくは腫瘍の増殖を阻害するように、ROR1抗体を患者に導入することができる。このような抗体が治療効果を発揮するメカニズムには、補体媒介性細胞溶解、抗体依存性細胞傷害、ROR1の生理的機能の調節、リガンド結合もしくはシグナル伝達経路の阻害、腫瘍細胞分化の調節、腫瘍血管新生因子の性質の変化、および/またはアポトーシス誘導が含まれると考えられる。ROR1抗体を毒物または治療薬と結合させ、ROR1を有する腫瘍細胞に毒物または治療薬を直接送達するために用いることも可能と思われる。毒物の例には、カルケミシン(calchemicin)、メイタンシノイド、¹³¹Iなどの放射性同位体、イットリウムおよびビスマスが非制限的に含まれる。

20

【0144】

抗ROR1抗体を用いる癌免疫療法は、結腸癌(Arlen et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138)、多発性骨髄腫(Ozaki et al., 1997, Blood 90: 3179-3186; Tsunenari et al., 1997, Blood 90: 2437-2444)、胃癌(Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52: 2771-2776)、B細胞リンパ腫(: Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93-101)、白血病(Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20: 581-589)、大腸癌(Moun et al., 1994, Cancer Res. 54: 6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55: 4398-4403)および乳癌(Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11: 117-127)を非制限的に含む、その他の種類の癌に対して首尾良く用いられているさまざまなアプローチによって得られた教示に従うことができる。いくつかの治療アプローチは、¹³¹Iと抗CD20抗体(例えば、Rituxan(商標)、IDEC Pharmaceuticals Corp.)との結合といった裸の抗体と毒素との結合を伴うが、また別のものはハーセプチン(商標)(トラスツズマブ)とパクリタキセル(Genentech, Inc.)というように抗体と他の治療薬との同時投与を伴う。乳癌の治療に対しては、例えば、ROR1抗体を放射線療法、化学療法またはホルモン除去と組み合わせ投与することができる。

30

【0145】

ROR1抗体療法は癌のすべての病期に対して有用であり得るが、抗体療法は進行期または転移性の癌に特に適していると思われる。化学療法をまだ受けていない患者には本発明の抗体療法を化学療法または放射線療法との併用が好まれ得るが、化学療法を1回または複数回受けた患者には本発明の抗体療法が必要であろう。さらに、特に化学療法薬の毒性に対する忍容性がそれほど高くない患者では、抗体療法により、併用化学療法に用いる投薬量を減らすことも可能になり得る。

40

【0146】

一部の癌患者では、好ましくは腫瘍組織の免疫組織化学的評価、定量的なROR1画像化またはROR1発現の存在および程度を確実に示し得る他の技法を用いて、ROR1発現の存在および程度を評価することが望ましいと思われる。この目的のためには、腫瘍生検または外科手術標本の免疫組織化学分析が好ましいと思われる。腫瘍組織の免疫組織化学分析のための方法は当技術分野で周知である。

【0147】

50

乳癌および他の癌の治療に有用な抗ROR1モノクローナル抗体には、腫瘍に対する強力な免疫応答を誘発し得るもの、および細胞傷害を導き得るものが含まれる。この点に関して、抗ROR1モノクローナル抗体(mAb)は補体媒介性または抗体依存性細胞傷害(ADCC)機構によって腫瘍細胞溶解を誘発し得るが、これはいずれも、免疫グロブリン分子がエフェクター細胞のFc受容体部位または補体タンパク質と相互作用するための完全なFc部分を必要とする。さらに、本発明の実施には、腫瘍増殖に対して直接的な生物効果を発揮する抗ROR1 mAbが有用である。このような直接的な細胞傷害性mAbが作用する潜在的メカニズムには、細胞増殖の阻害、細胞分化の調節、腫瘍血管新生因子のプロフィールの調節、およびアポトーシスの誘導が含まれ得る。特定の抗ROR1 mAbが抗腫瘍効果をもたらすメカニズムは、当技術分野で一般に知られたADCC、ADMMC、補体媒介性細胞溶解などを判定するために設計された任意の数のインビトロアッセイを用いて評価され得る。

10

【0148】

マウスもしくは他の非ヒトモノクローナル抗体、またはヒト/マウスキメラmAbの使用により、一部の患者では中等度から高度の免疫応答が誘発される得る。症例によっては、これは流血中からの抗体の排除および有効性の低下をもたらし得る。最も重篤な症例では、このような応答は大量の免疫複合体の形成につながり得、最終的には腎不全を引き起こし得る。したがって、本発明の治療方法の実施に用いられるいくつかのモノクローナル抗体は、標的であるROR1抗原と高い親和性で特異的に結合するが、患者における抗原性は低いか全くない完全ヒトまたはヒト化抗体である。

【0149】

本発明の治療方法は、単一の抗ROR1 mAbの投与のほか、異なるmAb(例えば、抗ROR1抗体および抗Her-2抗体)の併用またはカクテルを想定している。このようなmAbカクテルには、それらが異なるエフェクター機構を用いるmAbを含むか、または直接的な細胞傷害性mAbと免疫エフェクターの機能に依拠するmAbとの併用である場合、いくつか利点を有し得る。このようなmAbの併用は相乗的な治療効果をもたらし得る。さらに、抗ROR1 mAbの投与を、種々の化学療法薬、アンドロゲン拮抗薬および免疫調節薬(例えば、IL-2、GM-CSF)を非制限的に含む他の治療薬と組み合わせることもできる。抗ROR1 mAbは「裸の」または非結合形態で投与してもよく、治療薬と結合した形態でもよい。

20

【0150】

抗ROR1抗体製剤は、抗体を腫瘍部位へと送達し得る任意の経路を介して投与することができる。有効と考えられる経路には、静脈内、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内などが非制限的に含まれる。治療は一般に、静脈内注射(IV)などの許容し得る投与経路を介した、典型的には約0.1~約10mg/kg体重の範囲の投与量での、抗ROR1抗体製剤の反復投与を含み得る。1週間当たり10~500mg mAbの投与量であれば有効であって忍容性も十分と思われる。

30

【0151】

転移性乳癌の治療におけるハーセプチンmAbの臨床的経験に基づき、抗ROR1 mAb製剤のIVによる約4mg/kg患者体重の初回投与後にIVにより毎週約2mg/kgを投与するのが許容される投薬レジメンであり得る。初回投与は90分間またはそれ以上にわたる注入によって行うことが好ましい。定期的な維持投与は、初回投与量に対する忍容性が十分であれば30分間またはそれ以上にわたる注入によって行う。しかし、当業者は理解するであろうが、個々の症例における理想的な投薬方式にはさまざまな因子が影響すると思われる。このような因子には、例えば、用いるAbまたは複数のmAbの結合親和性および半減期、患者におけるROR1発現の程度、流血中の脱落ROR1抗原の程度、抗体の望ましい定常濃度レベル、投与頻度、ならびに本発明の方法と併用する化学療法薬の影響が含まれる。

40

【0152】

ROR1タンパク質機能の阻害

本発明は、ROR1とその結合パートナーもしくはリガンドとの結合、または他のタンパク質との会合を阻害するためのさまざまな方法および組成物、ならびにROR1機能を阻害するための方法を含む。

【0153】

50

細胞内発現抗体によるROR1の阻害

1つのアプローチでは、ROR1と特異的に結合する一本鎖抗体をコードする組換えベクターを遺伝子導入技術によってROR1発現細胞に導入し、コードされる一本鎖抗ROR1抗体を細胞内で発現させ、ROR1タンパク質と結合させてそれによってその機能を阻害する。このような細胞内発現型の一本鎖抗体を作製するための方法は周知である。このような細胞内発現抗体は「細胞内抗体」としても公知であり、細胞内の特定の区画を特異的な標的とし、治療の阻害活性を集中させようとする領域を高度に制御することを可能にする。この技術は当技術分野で首尾よく用いられている(概説については、Richardson and Marasco, 1995, TIBTECH vol.13を参照されたい)。細胞内抗体は通常であれば豊富に存在する細胞表面受容体の発現を事実上消失させることが示されている。例えば、Richardson et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3137-3141; Beerli et al., 1994, J. Biol. Chem. 269:23931-23936、Deshane et al., 1994, Gene Ther. 1:332-337を参照されたい。

【0154】

一本鎖抗体は、柔軟なリンカーポリペプチドによって連結された重鎖および軽鎖の可変領域を含み、単一のポリペプチドとして発現される。任意で、一本鎖可変領域断片に軽鎖定常領域が連結したのものとして一本鎖抗体を発現させてもよい。発現された細胞内抗体が所要の細胞内区画を正確に標的とするように、周知の細胞内輸送シグナルを、このような一本鎖抗体をコードする組換えポリヌクレオチドベクターに組み込むことができる。例えば、リーダーペプチドおよび選択的にはKDELアミノ酸モチーフなどのC末端ER残留シグナルが小胞体(ER)を標的とする細胞内抗体に組み込まれるように操作し得る。核内で活性を発揮させようとする細胞内抗体は、核局在化シグナルを含むように操作することができる。原形質膜の細胞質側に係留するために、脂質部分を細胞内抗体に連結してもよい。細胞質内で機能を発揮するように細胞内抗体の標的化を行うこともできる。例えば、細胞質内の因子を隔離し、それによってそれらが細胞内の通常の目的地に輸送されることを妨げるために、細胞質細胞内抗体を用いることができる。

【0155】

1つの態様において、細胞内抗体は、核内のROR1を捕捉し、それによってその成熟および細胞外への分泌を阻止するために用い得る。所要のターゲティングを実現するために、核を標的とするシグナルおよび/またはリーダーペプチドをこのようなROR1細胞内抗体に組み込むこともできる。このようなROR1細胞内抗体を、特定のROR1ドメインと特異的に結合するようにデザインすることもできる。もう1つの態様において、ROR1タンパク質と特異的に結合する細胞質細胞内抗体を、ROR1が核に到達することを妨げ、それによってそれが核内部で何らかの生物活性を発揮するのを妨げる(例えば、ROR1が他の因子と転写複合体を形成するのを妨げる)ために用いることもできる。

【0156】

組換えタンパク質によるROR1の阻害

もう1つのアプローチでは、ROR1またはその結合パートナーと結合し、それによってROR1がその結合パートナーに到達/結合すること、または別のタンパク質と会合することを妨げることができる組換え分子が、ROR1の機能を阻害するために用いられる。例えば、組換え分子は、ROR1のIgルーブドメイン、ROR1のfrizzledドメイン、またはROR1のkringleドメインといった、ROR1の細胞外ドメインまたはその一部分を含み得る。本発明のいくつかの態様において、組換え分子はこれらのROR1ドメインの2つ、または代替的には3つを含む。

【0157】

または、このような組換え分子が、ROR1特異的抗体分子の反応性部分を含んでもよい。1つの具体的な態様では、ROR1結合パートナーのROR1リガンド結合ドメインが、ヒトIgG1などのヒトIgGのFc部分と連結した2つのROR1リガンド結合ドメインを含む二量体融合タンパク質に組み込まれる。このようなIgG部分は、例えば、CH2およびCH3ドメインならびにヒンジ領域を含むが、CH1ドメインは含まない。このような二量体融合タンパク質は、乳癌を非制限的に含む、ROR1の発現と関連性のある癌に罹患した患者に可溶性形態として投

与することができ、この際、二量体融合タンパク質はROR1と特異的に結合し、それによってROR1の受容体または他の結合パートナーとの相互作用を阻害する。既知の抗体連結技術を用いて、このような二量体融合タンパク質をさらに組み合わせると多量体タンパク質とすることもできる。

【0158】

ROR1の転写または翻訳の阻害

治療的アプローチのもう1つの分類に含まれるものとして、本発明は、ROR1遺伝子の転写を阻害するためのさまざまな方法および組成物を提供する。同様に、本発明は、ROR1 mRNAのタンパク質への翻訳を阻害するための方法および組成物も提供する。

【0159】

1つのアプローチにおいて、ROR1遺伝子の転写を阻害する方法は、ROR1遺伝子をROR1アンチセンスポリヌクレオチドと接触させる段階を含む。もう1つのアプローチにおいて、ROR1 mRNAの翻訳を阻害する方法は、ROR1 mRNAをアンチセンスポリヌクレオチドと接触させる段階を含む。もう1つのアプローチでは、ROR1メッセージを切断し、それによって翻訳を阻害するためにROR1特異的リボザイムが用いられる。この種のアンチセンスおよびリボザイムに基づく方法を、ROR1プロモーターおよび/またはエンハンサーエレメントなどのROR1遺伝子の調節領域に向けて行うこともできる。同様に、ROR1遺伝子の転写因子を阻害し得るタンパク質を、ROR1 mRNAの転写を阻害するために用いることもできる。前記の方法に有用な種々のポリヌクレオチドおよび組成物は上記の通りである。転写および翻訳を阻害するためのアンチセンスおよびリボザイムの使用は当技術分野で周知である。

【0160】

ROR1の転写活性化を妨げることによってROR1の転写を阻害する他の因子も、ROR1を発現する癌の治療に有用と思われる。同様に、ROR1のプロセッシングを妨げることができる因子も、ROR1を発現する癌の治療に有用と思われる。このような因子を利用する癌治療法も本発明の範囲に含まれる。

【0161】

治療戦略に関する一般的考察

ROR1を合成する腫瘍細胞に対して治療用ポリヌクレオチド分子(すなわち、アンチセンス、リボザイム、細胞内抗体および他のROR1阻害分子をコードするポリヌクレオチド)を送達するために、遺伝子導入および遺伝子治療技術を用いることができる。数多くの遺伝子治療アプローチが当技術分野では公知である。ROR1アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、ROR1の転写を妨げることが可能な因子、成熟ROR1のプロセッシングおよび/または分泌を妨げることが可能な因子などをコードする組換えベクターを、このような遺伝子治療アプローチを用いて標的腫瘍細胞に送達することができる。

【0162】

上記の治療アプローチを化学療法または放射線療法と併用してもよい。これらの治療アプローチにより、特に化学療法薬の毒性に対する忍容性がそれほど高くない患者では、併用化学療法に用いる投薬量を減らすことも可能になると考えられる。

【0163】

個々の組成物(例えば、抗体、リボザイム、細胞内抗体)またはこのような組成物の組み合わせの抗腫瘍活性は、種々のインビトロおよびインビボアッセイ系を用いて評価し得る。治療能力を評価するためのインビトロアッセイには、細胞増殖アッセイ、軟寒天アッセイおよび発癌促進活性を示す他のアッセイ、治療的組成物がROR1と結合パートナーとの結合を阻害する程度を決定し得る結合アッセイが含まれる。

【0164】

インビボでは、ROR1治療的組成物の効果を、適した動物モデルで評価することができる。例えば、ヒト乳癌移植片または継代した異種移植片組織をヌードマウスまたはSCIDマウスなどの免疫機能低下動物に導入したゼノジニック乳癌モデルは、乳癌に関して適切であり、当技術分野で記載されている。腫瘍形成、腫瘍退縮または転移の抑制などを測定するアッセイを用いて、有効性を予測することが可能であり得る。

10

20

30

40

50

【0165】

アポトーシスの促進を定性的に評価するインビボアッセイも、治療的組成物の可能性があるものの評価に有用と思われる。1つの態様では、治療的組成物を投与したマウスから得た異種移植片をアポトーシス病巣の存在に関して検査し、未処置対照異種移植片を有するマウスと比較する。投与マウスの腫瘍内に認められるアポトーシス病巣の程度は、組成物の治療効果の指標になると考えられる。

【0166】

前記の方法の実施に用いられる治療的組成物を、所望の送達法のために適した担体を含む医薬組成物へと製剤化することもできる。適した担体には、治療的組成物と配合した際に治療的組成物の抗腫瘍機能を保っていて、しかも患者の免疫系と反応しないような任意の材料が含まれる。その例には、滅菌リン酸緩衝生理食塩液、滅菌精製水といったさまざまな標準的な薬学的担体のうち任意のものが非制限的に含まれる(概論については、「Remington's Pharmaceutical Sciences」, 16th Ed, A. Osal. Ed, 1980を参照されたい)。

10

【0167】

治療製剤を溶解し、治療的組成物を腫瘍部位へと送達し得る任意の経路を介して投与することができる。有効と考えられる投与経路には、静脈内、非経口的、腹腔内、筋肉内、腫瘍内、皮内、臓器内、同所性などが非制限的に含まれる。静脈内注射のために好ましい製剤は、滅菌精製水の保存溶液、新鮮滅菌水、および/または米国薬局方(USP)の0.9%滅菌塩化ナトリウム注射液を含むポリ塩化ビニルもしくはポリエチレンバッグ中に希釈された形で治療的組成物を含む。治療用タンパク質製剤を、凍結乾燥して好ましくは真空下にて滅菌粉末として保存した上で、注射前に例えばベンジルアルコール防腐剤を含む滅菌精製水、または滅菌水で再構成することもできる。

20

【0168】

前記の方法を用いる癌の治療のための投与量および投与のプロトコールは、方法および標的の癌によって異なると考えられ、一般には、当技術分野で認識されている数多くの他の因子に依存すると考えられる。

【0169】

キット

上記において記載および提案した診断的および治療的用途に用いるために、キットも本発明によって提供される。このようなキットは、バイアル、管などの1つまたは複数の容器手段を密に拘束して収容するために区画化された担体手段を含み、容器手段のそれぞれは本方法に用いる別々の要素の1つを含む。例えば、容器手段の1つは、検出可能な標識がなされているか、またはそれが可能なプローブを含む。このようなプローブは、ROR1タンパク質またはROR1遺伝子もしくはメッセージに対してそれぞれ特異的な抗体またはポリヌクレオチドであってよい。標的核酸を検出するためにキットが核酸ハイブリダイゼーションを利用する場合には、キットは標的核酸配列の増幅のためのヌクレオチドを含む容器、および/または酵素性、蛍光性もしくは放射性ヌクレオチド標識などのレポーター分子を結合させたアビジンまたはストレプトアビジンなどのビオチン結合タンパク質などのレポーター手段を含む容器も有し得る。

30

【0170】

本発明の1つの典型的な態様は、容器、前記容器上のラベル、および前記容器の内部に含まれる組成物を含むキットであって、組成物が、SEQ ID NO: 1に示されたROR1ポリヌクレオチドの相補物とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする(またはSEQ ID NO: 1に示されたROR1ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと結合する)ROR1特異的抗体および/またはポリヌクレオチドを含む組成物を含み、前記容器上のラベルが、組成物を少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用い得ること、ならびにROR1抗体および/またはポリヌクレオチドを少なくとも1つの型の哺乳動物細胞におけるROR1タンパク質、RNAまたはDNAの存在の評価に用いるための指示を示しているキットである。

40

【0171】

50

本発明のキットは、典型的には、上記の容器、ならびに緩衝剤、希釈剤、針、シリンジおよび使用上の指示を含む添付文書といった商業的および使用者の立場からみて望ましい材料を含む、1つまたは複数の他の容器を含むと考えられる。ラベルは、組成物が特定の治療法または非治療的な用途のために用いられることを示すために容器上に存在してよく、上記のもののようなインビボまたはインビトロ用途のための指示を示してもよい。

【0172】

ROR1などの遺伝子を発見するための方法

本開示は、ROR1を診断的意義のある遺伝子として同定するために用いたものを含む、最適化されたデータマイニング方法も提供する。これらの方法は、新規な実験分析ならびに制約ベースの公開データ分析を含む。本発明のこれらの方法は、多種多様な順序で行い得る数多くの慎重な操作および段階を含む。続いて、ROR1などの関心対象の遺伝子を同定するために、これらの段階を組み合わせる。予備的な段階では、当業者は、例えば実験的に得られた遺伝子リストおよび/または文献に基づく遺伝子の選択から、遺伝子ワーキングセットを規定することができる。別の段階では、当業者は、例えば+/-HER-2細胞系、+/-リガンド/アンタゴニスト、原発性乳癌、乳癌細胞株などにおける遺伝子発現に関するマイクロアレイスクリーニングを行うことができる。別の段階では、当業者は、例えば、候補選択用パラメーターを用いて、乳癌の進行の一因となる可能性が高いシグナル伝達経路へとグループ化され得る遺伝子(例えば、RTK(受容体チロシンキナーゼ))に対象を絞って関心対象の遺伝子を同定することができる。別の段階では、当業者は、定量的PCR、ノーザン法およびウエスタン分析などの周知のプロトコールにより、関心対象の遺伝子の発現を評価および/または確認することができる。別の段階では、当業者は、以前の過程の結果に基づいて、例えば、ROR1発現を1つもしくは複数の乳癌サブタイプおよび/または予後不良と関連付ける仮説などのような仮説を立てて検証することができる。この段階で、当業者は、発現パターンの機能的意義をバイオアッセイおよび細胞系モデルを用いて測定し得るか否かといった要因を検討することができる。例えば、発現の差異についてさらに評価するためにヒト腫瘍組織を用いること、およびインビボでの観察所見の機能的重要性を確かめるために異種移植片モデルを用いることができる。

【0173】

このような例示的なデータマイニング方法の一つにおいて、最初の観察所見は、例えばROR1などの遺伝子の興味深い特徴を同定するための、公開発現データおよび細胞系データの制約ベースの分析によって得られる。続いて、この最初の観察所見を用いて、乳癌サブタイプを予後不良およびROR1(分子標的候補)と関連付ける仮説を立てることができる。続いて、該当する乳癌細胞株および腫瘍におけるROR1過剰発現を検証することができる。その後には、乳癌の病因におけるROR1の生物学的機能を裏付ける実験データを得ることができる。

【0174】

1つの例示的な態様において、最初の観察所見は、公開発現データの制約ベース分析によって得られる。この態様において、受容体チロシンキナーゼおよびそのリガンドを含む遺伝子ワーキングセットを選択することができる。続いて、例えば、Van't Veer, L. J., et al.(2002) Nature 415, 530-536(「Rosetta/Netherlands」)における開示内容を、Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Sep 11; 98(19): 10869-74におけるものと統合することにより、この選択物と当技術分野で公知の他の研究を統合することができる。手短に述べると、Van't Veer et al.(2002) Nature 415, 530-536は、同じ疾患病期にある乳癌患者が顕著に異なる治療反応および全体的転帰を示すことを指摘している。この研究で、Van't Veerらは、117例の若齢患者の原発性乳房腫瘍に対するDNAマイクロアレイ分析を用い、診断時に局所リンパ節に腫瘍細胞のない(リンパ節陰性)患者における短期間の遠隔転移を強く予測させる遺伝子発現サイン(「予後不良」サイン)を同定するために教師あり分類を適用した。このようにして彼らは、例えばBRCA1保有者の腫瘍を識別するサインを確立し、この遺伝子発現プロファイルが、疾患の転帰の予測に現在用いられている臨床的パラメーターよりも優れることを教示している。Van't Veerらは、予後との

10

20

30

40

50

相関係数の強度に基づく78件の散発性腫瘍の3段階からなる教師ありクラスター化により、差異を伴って発現される5000種の遺伝子から、5年以内の遠隔転移を83%の精度で予測する70種の遺伝子サブセットを同定したことを教示している。

【0175】

同様に、Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Sep 11; 98(19): 10869-74のStanford/Norway研究でも、cDNAマイクロアレイに由来する遺伝子発現パターンの差異に基づき、腫瘍の特徴を臨床的転帰と関連付けるために乳癌を分類している。この論文では、有意に異なる臨床的転帰と関連性のある数多くの乳癌サブタイプを特定している。これらの乳癌サブタイプには、基底状、ERBB2陽性ならびに管腔性サブタイプAおよびBが含まれる(例えば、Sorlie et al. 前記中の図1を参照されたい)。

10

【0176】

協調的遺伝子発現パターンを予後分類の一部として分析するクラスター化アルゴリズムを用いることができる。この分析は治療標的の同定も可能とする。本発明のいくつかの態様において、この段階は、疾患、増殖調節障害、細胞周期などに関与する(またはそれに関与することが公知であるタンパク質と相同性のあるドメインを有する)もののように疾患進行にとって重要な可能性が高い遺伝子および経路を対象を絞った、病因の制約ベースの仮説の構築を含む。遺伝子発現プロファイルを用いる標的の同定のためのこのような制約ベースの方法では、乳癌が異種混交的であること、予後予測マーカーおよび分子(すなわち、ER、HER-2)が乳癌のサブタイプに重要なことがすでに示されていること、ならびに同じ遺伝子セットがすべての乳癌において「予後予測的」である、または適切な治療標的であるという可能性は低いことという観察所見などの、さまざまな要因を考慮することができる。

20

【0177】

本方法の1つの例示的な態様では、例えば、任意で散発性および/または遺伝性の癌(例えば、BRCA1および/または2性の腫瘍)から選択された分析用のデータセット(例えば、ある数の遺伝子)を選択することができる。続いて、乳癌関連遺伝子(例えば、omim、乳癌データベース、ncbiなどの公知のデータベース中のもの)、Stanford腫瘍型マーカー、ERBB2により調節される遺伝子(細胞系データから)、ケモカインおよび受容体チロシンキナーゼおよびリガンド、上皮接合タンパク質などの分析のために、ある遺伝子セットを対象を絞ることができる。続いて、遺伝子ワーキングセットを同定するために、特定の遺伝子(例えば、ERBB2およびESR1など)の発現レベルおよび/またはBRCA1変異の状態などに従って試料を分類することができる。例えば、Wilson et al., Breast Cancer Research Vol 6 No . 5: 192-200(2004)(これは参照として組み入れられる)は、エストロゲン受容体1の発現およびHER2の増幅を用いて乳癌サブタイプを定義し得ることを教示している。

30

【0178】

これらの段階に続いて、例えば、以上に考察したStanford/Norway分類と概ね等価な、重複しない試料を有する群を描写することができる。1つの態様において、散発性腫瘍試料をまずHER2発現に基づいて分類し、残りの試料をESR1発現によってグループ分けすることができる。HER2+試料がいずれもESR1比 > 0 であるため、散発性腫瘍カテゴリーは非重複性のものとなり得る。BRCA変異を有する試料は別個に分類することができる。このようなグループ分けでは、BRCA腫瘍のすべてでESR1 < 0 かつHER2 < 0 であることが示されている。HER2+腫瘍およびESR1-腫瘍は最も悪い予後を示し、ESR1++腫瘍がそれに次ぐ。

40

【0179】

この遺伝子ワーキングセットの分析のいくつかの態様において、「クラスター」データではなく「bin」データを用いることができ、例えば、試料全体および群別でのアップレギュレート性およびダウンレギュレート性の遺伝子の頻度を定量するためにマトリックスを構築することができる。任意で、諸腫瘍群における遺伝子ワーキングセットのメンバーの同時発現を調べることもできる。また、腫瘍群別に病因に関する仮説を立てることもできる。このようにして、標的の候補を同定し、統計学的有意性に関して検証することができる。例示的なワーキングセットには、既知の乳癌遺伝子、Stanford腫瘍型マーカー、ER

50

BB2により調節される遺伝子、ケモカイン/RTKおよびリガンド、ならびに/または上皮接合タンパク質が含まれる。binデータに関しては、続いてデータマトリックスを作ることができ、これには例えば以下のものがある：レベル1：それぞれの遺伝子/試料に関する比；レベル2：各遺伝子/試料の二進値；レベル3：遺伝子/群による全体的な増加または低下；レベル4：同時発現性の遺伝子ファミリー/群。任意で、受容体チロシンキナーゼを対象に絞ることができ、その遺伝子ワーキングセットには、例えば、Rosetta/Netherlandsデータ(考えられる130種のユニークなRTKおよびそれらのリガンドのうち127種を表している147個の要素)で得られる、すべてのRTKおよびそれらのリガンドが含まれる。続いて、腫瘍群に特異的なRTK/リガンド発現を同定することができる。

【0180】

この方法の諸態様を、関心対象の遺伝子としてのROR1の同定のために用いた。ROR1は、基底状腫瘍およびBRCA1腫瘍において特異的にアップレギュレートされる受容体チロシンキナーゼである。図Bは、Rosetta/NetherlandsデータにおけるROR1 mRNA発現を示している。ROR1は、チロシンキナーゼ様ドメインを有する細胞表面受容体の新規なファミリーである(Masiakowski et al., JBC, 267 26181-26190(1992)を参照。ROR1/2に対するリガンドは知られていないが、CRD(システインリッチドメイン)またはfrizzledドメインの存在から、RORがWNTと結合する可能性が示唆される。

【0181】

本明細書に開示したように、これらの方法は、ROR1の生物学的な働きに関する仮説の構築、ならびにROR1発現を予後および/または乳癌サブタイプなどと相関付ける検定の設計を可能にする。例えば、このアプローチを用いて、本発明者らは、基底状乳癌およびBRCA1乳癌が細胞起源および分子的病因によって関連付けられること、ならびにROR1の過剰発現がこれらの2つの腫瘍群にかかわる重要な変化であることを見いだした。図4Aに示されているように、ROR1を過剰発現する腫瘍は、Rosetta/Netherlands腫瘍における予後不良と関連付けられる。ROR1群における予後不良腫瘍のパーセンテージ(散発例の70%)は、HER-2、EGFR、VEGF、FLT3、myc、UPAおよびPAIを含む、分析された他のあらゆる単一の予後遺伝子よりも高い。図4Bに示されているように、この所見は、HER-2を過剰発現する腫瘍の54%が予後不良試料であるという、HER-2で観察されているものに類似している。

【0182】

該当する乳癌細胞株および腫瘍におけるROR1過剰発現の意義はさらにさまざまなやり方で検証することができる。ROR1遺伝子は位置1p31.3に位置する。さらに、ROR1を過剰発現する細胞系は基底状または間葉性の特徴を有する。もう1つの要素として、ROR1のすぐ遠位側にあるAK000776も、RosettaチップなどのDNAマイクロアレイ上に存在する。ROR1およびAK000776は強い正の直線的相関を示す。図5Aにおけるノーザンプロット分析は、さまざまな乳癌細胞株におけるROR1 mRNA発現を示している。このデータは、腫瘍データの第4群および第6群で観察されたROR1発現を裏付ける。

【0183】

関心対象の遺伝子としてのROR1の同定、およびこの観察所見に関するその後の検証により、以上に開示したデータマイニング方法の威力が示されている。

【0184】

実施例

本発明のさまざまな局面を、以下のいくつかの実施例によって記載および例示するが、これらはいずれも本発明の範囲を限定するものではない。

【0185】

実施例1：哺乳動物系における組換えROR1の作製

組換えROR1を発現させるために、6Hisタグをカルボキシ末端に有するもの(pCDNA 3.1 myc-his, Invitrogen)のような、当技術分野で公知の発現ベクター中に完全長ROR1 cDNAをクローニングすることができる。構築物はMCF-7細胞などの適切な細胞にトランスフェクトすることができる。また、以下のように、ROR1遺伝子をpSR MSVtkneoなどのレトロウイルス発現ベクター中にサブクローニングし、ROR1を発現する細胞株の樹立のために用い

10

20

30

40

50

ることできる。ROR1コード配列(翻訳開始ATGから終結コドンまで)は、ROR1 cDNAからのds cDNAテンプレートを用いるPCRによって増幅することができる。PCR産物をベクター上のEcoRI(平滑末端化)およびXbaI制限部位によってpSR MSVtkneoにサブクローニングし、DH5 コンピテント細胞に形質転換導入する。コロニーを摘出し、cDNA上に特有の内部制限部位を有するクローンに関するスクリーニングを行う。陽性クローンをcDNAインサートのシーケンシングによって確かめる。その後、レトロウイルスを感染、および例えばNIH 3T3、TsuPr1、MCF-7またはrat-1細胞を用いた種々の細胞系の作製のために用いることもできる。

【0186】

実施例2: ROR1ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の作製

10

ポリクローナル抗体は、例えば、免疫処置物質および(必要に応じて)アジュバントの1回または複数回の注射により、ウサギなどの哺乳動物で産生させることができる。典型的には、免疫処置物質および/またはアジュバントは、多回の皮下注射または腹腔内注射によって哺乳動物に注入されると考えられる。典型的には、免疫処置物質には、RORタンパク質またはその融合タンパク質の全体または部分が含まれ得る。

【0187】

例えば、Ig C2様ドメインおよびfrizzledドメインを含むROR1の一部(「IF」と命名)を、ベクターpET32A(Novgen)中にクローニングし、Thio/HIS融合タンパク質として発現させた。このタンパク質構築物は、不溶性の封入体において高度に発現される。6M尿素中に溶解させると、この融合タンパク質は変性条件下でNiカラムと効率的に結合する。続いて、ウサギに対してこの融合タンパク質による免疫処置を行い、その後ポリクローナル血清を得るために採血した。図5Fおよび図5Gは、SKBR細胞を比較用癌細胞として用いた、このウサギポリクローナル血清を用いてのCAL51細胞における内因性ROR1タンパク質の検出を示している。

20

【0188】

ポリクローナル抗体と同様に、モノクローナル抗体も当技術分野で周知の方法によって作製することができる。例えばROR1モノクローナル抗体を作製するためには、ROR1タンパク質を含む融合タンパク質(例えば、グルタチオントランスフェラーゼ)を合成し、免疫原として用いることができる。ROR1抗体を作製するための方法のもう1つの例では、HISタグを付加したfrizzledドメインなどのRORドメインを含む免疫原を調製する。この構築物をバキュロウイルスベクターに挿入し、続いてそれを、自然な状態の(折り畳まれた)免疫原性タンパク質が培地中に分泌されるような様式で昆虫細胞に導入することができる。任意で、免疫処置の前に免疫原を、免疫応答を誘発することが知られたKLHなどの第2のタンパク質と結合させることもできる。または、ROR1 IF免疫原構築物を細菌内で作ることもできる。免疫原性タンパク質が不溶性である状況では、それを任意で免疫処置の前に尿素で変性させることができる。または、ROR1完全ECD免疫原構築物をIg融合構築物の一部として作製し、続いて哺乳動物細胞(例えば、CHO細胞)で発現させ、免疫処置の前にIg部分の融合構築物を精製することもできる。

30

【0189】

1つの例示的な態様では、マウスにまず、ROR1のFRZドメインを含む適切な量の免疫原を用いて免疫処置(例えば、腹腔内)を行う。任意で、免疫原をKLHと結合させること、および/または完全フロイントアジュバント中に混合することもできる。マウスにはその後、任意でフロイント不完全アジュバントと混合して、免疫処置を行うことができる(例えば、このROR1免疫原を用いて2週間毎に)。免疫処置マウスからの血清の反応性は、このROR1免疫原を用いるELISAによってモニターすることができる。最も強い反応性を示すマウスを安静下に置き、免疫原の最後の注射を行った後に屠殺する。続いて、屠殺したマウスの脾臓を採取し、標準的な手順を用いてSPO/2骨髄腫細胞と融合させる。ROR1特異的抗体を産生するクローンを同定するために、典型的には、HAT選択後の増殖ウェルからの上清をELISAおよびウエスタン法によってスクリーニングする。

40

【0190】

50

ROR1モノクローナル抗体の結合親和性は、標準的な技術を用いて決定することができる。親和性測定は抗体とエピトープとの結合の強さを定量するものであり、どのROR1モノクローナル抗体が診断または治療の用途に好ましいかを明らかにするための一助として用いることができる。BIAcoreシステム(Uppsala, Sweden)は、結合親和性を決定するための一般的な方法の一つである。BIAcoreシステムは、表面プラスモン共鳴(SPR, Welford, K., 1991, Opt. Quant. Elect. 23: 1; Morton and Mysza, 1998, Methods in Enzymology 295: 268)を利用して、生体分子の相互作用をリアルタイムにモニターする。BIAcore分析により、会合速度定数、解離速度定数、平衡解離定数および親和性定数が首尾良く得られる。

【0191】

10

実施例3: RT-PCR発現分析

細胞におけるROR1発現を分析するためのさまざまなPCRプロトコールが当技術分野で周知である。以下は、1つの典型的なプロトコールを提示している。

【0192】

第一鎖cDNAは、オリゴ(dT)12-18プライミングなどのプライマーを用い、Gibco-BRL Superscript Preamplificationシステムなどの市販のシステムを用いて、十分な量(例えば、1 μ g)のmRNAから作製することができる。製造元のプロトコールを用いることができる。これらには一般に、逆転写酵素との42 $^{\circ}$ Cでの50分間のインキュベーションに続いて、RNAアーゼH処理を37 $^{\circ}$ Cで20分間行うことが含まれる。反応が完了した後に、標準化の前に水で容積を増やすことができる。正常組織および癌組織からの第一鎖cDNAの標準化は、 β -アクチンなどのハウスキーピング遺伝子に対するプライマーを用いることによって行い得る。例えば、第一鎖cDNA(5 μ l)を、0.4 μ Mのプライマー、0.2 μ Mの各dNTP、1 \times PCR緩衝液(Gibco-BRL, 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, pH8.3)および1 \times Platinum Taq DNAポリメラーゼ(Gibco-BRL)を含む総容積50 μ l中で増幅させることができる。PCRは、サーマルサイクラーを以下の条件で用いて行うことができる: 初期変性を94 $^{\circ}$ Cで45秒間行い、その後94 $^{\circ}$ C 45秒間、58 $^{\circ}$ C 45秒間、72 $^{\circ}$ C 45秒間を18サイクル、20サイクルおよび22サイクル行う。72 $^{\circ}$ Cでの最終伸長を2分間かけて行う。PCR反応物5 μ lを18サイクル、20サイクルおよび22サイクルで採取して、アガロースゲル電気泳動に用いることができる。アガロースゲル電気泳動の後に、多組織からの283b.p.の β -アクチンバンドのバンド強度を目視検査によって比較する。22サイクルのPCR後の全組織における β -アクチンバンド強度が等しくなるように、第一鎖cDNAに関する希釈係数を算出することができる。22サイクルのPCR後の全組織におけるバンド強度を等しくするためには3回の標準化が必要なことがある。ROR1遺伝子の発現レベルを決定するためには、標準化された第一鎖cDNAの5 μ lを、26サイクルおよび30サイクルの増幅を用いるPCRによって分析する。定量的発現分析は、所定のバンド強度をが得られるサイクル数でPCR産物を比較することによって行い得る。RT-PCR発現分析を、多数の正常試料および癌試料からの組織のプールを用いて作製された第一鎖cDNAに対して行うことができる。cDNA標準化は、 β -アクチンなどのハウスキーピング遺伝子を用いたすべての遺伝子で実証することができる。

20

30

【0193】

実施例4: 基底状ER陰性乳癌におけるROR1の役割の検討

40

大規模な乳癌コホートの免疫組織化学試験およびmRNA発現プロファイリング試験により、乳癌の基底層に特徴的なサイトケラチン5などのマーカーを発現する腫瘍のサブセットが再現性を伴って同定されている(例えば、Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 8418-23; Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 10869-74; およびFoulkes et al., J Natl Cancer Inst. 2003; 95: 1482-5を参照されたい)。これらの悪性腫瘍は、幹細胞属性を備えた基底部または基底上部の前駆細胞から生じることが示唆されている。これは単純な腺様サイトケラチン(K8/18/19)を均一に発現する多くのヒト乳癌(このことはそれらの起源が形質転換した管腔上皮細胞であることを示唆する)とは対照的である。基底状の特徴を備えたヒト乳癌は、常にエストロゲン受容体(ER)陰性であり、増幅されたHER-2を含むことは稀であり、一般に高グレード/低分化型であり、予後

50

不良と関連性がある(例えば、Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 8418-23; Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 10869-74; および Foulkes et al., J Natl Cancer Inst. 2003; 95: 1482-5を参照されたい)。

【0194】

基底癌はp53変異の頻度が高いことと関連付けられており、BRCA1保有者で生じる腫瘍はこの基底状クラスに該当するものの(例えば、Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 8418-23; Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 10869-74; および Foulkes et al., J Natl Cancer Inst. 2003; 95: 1482-5を参照されたい)、これらの腫瘍の進行を生じさせる発癌分子および鍵となる分子経路は不明である。本明細書に開示したように、マイクロアレイプロファイリングおよびノーザンブロット法による確認を用いて、本発明者らは、ROR1受容体チロシンキナーゼが、ER陰性の基底状表現型を備えた原発性ヒト乳癌で高度に発現されることを示した。本発明者らはまた、基底性マーカーを同時発現するいくつかのヒト乳癌細胞株における高度のROR1発現も見いだしているが、管腔細胞系ではROR1発現が検出されなかった。重要なこととして、基底状悪性細胞系で検出されたROR1発現のレベルは非悪性細胞よりも有意に高かった。ROR1のもう一つの特徴は、それが細胞外frizzledドメインを介してwntリガンドと結合するかもしれないことであり、これは前駆細胞を調節することが以前に示されているシグナル伝達経路とつながる可能性がある(例えば、Saldanha et al., Protein Sci. 1998; 7: 1632-5を参照されたい)。

10

【0195】

本明細書に提示した本開示は、ほとんど解明されていないこれらの基底状ER陰性ヒト乳癌の進行を生じさせる候補遺伝子を当業者が同定することを可能にする。特定の科学理論に拘束されるわけではないが、ROR1の示唆に富む発現パターンと、腫瘍形成における受容体チロシンキナーゼ(例えば、HER2、EGFR、VEGFR)の確立された意義とを合わせて考えることにより、本発明者らは、ROR1が基底状腫瘍の発生メカニズムにおいて極めて重要な役割を果たしているという仮説を立てるに至った。ROR1の発癌能力はこれまで検討されていなかった。

20

【0196】

ROR1がマウス乳腺の基底/前駆細胞を選好的に形質転換させるという仮説を検証する第1のセットの実験。

30

ROR1の誘導性過剰発現がマウス乳腺上皮細胞を形質転換させ得るか否かの判定。

トランスジェニック性の条件的Tet0-ROR1マウスを作製し、既存のMMTV-rtTAMウスと交配させることで(例えば、Gunther et al., FASEB J. 2002; 16: 283-92)、乳腺に特異的なROR1のドキシサイクリン依存性(tet-on)発現を実現させることができる。

ROR1過剰発現が乳腺の基底/前駆細胞系列を選好的に形質転換させ得るか否かの判定。

続いて、乳腺および他の組織の基底/前駆細胞区画において特異的な発現を生じさせるために、これらのTet0-ROR1マウスを、ケラチン5(K5)プロモーターの制御下でrtTAを発現する系統と交配させることができる。

【0197】

例示的な方法：

40

MMTV-rtTA/Tet0-ROR1マウスおよびK5-rtTA/Tet0-ROR1マウスにおける導入遺伝子の発現を、6週齢から始めて、ドキシサイクリンによって誘導することができる。ROR1の発現はインサイチューハイブリダイゼーション、ノーザンブロット法および免疫組織化学によって調べることができる。組織構造の変化および前悪性病変または悪性病変の存在は、導入遺伝子の導入後に、カルミン染色した乳腺ホールマウント物ならびにヘマトキシリンおよびエオシンで染色した組織切片の分析により、頻繁な間隔で分析することができる。任意の過形成病変または顕性の癌の細胞起源は、中間径フィラメントマーカー、接着タンパク質、および幹細胞マーカーと推定されるもの(管腔細胞に関してはK8/K18/K19、基底/前駆細胞に関してはK5/K6/K14/P-カドヘリン/Sca-1)を用いた免疫組織化学染色を用いて調べることができる。バックアップとして、K14-rtTaマウスはROR1発現を生じるものとみなす

50

ことができる。

【0198】

妥当性：

基底特性を備えたヒト乳癌は、常にER陰性であり、増幅されたHER-2を稀にしか含まないために、抗エストロゲンまたはハーセプチンといった確立された標的療法に反応しない悪性度の高い悪性腫瘍である。ROR1細胞表面受容体は、モノクローナル抗体または低分子チロシンキナーゼインヒビターが到達する、扱いやすい治療標的である。ROR1過剰発現がマウスにおいて基底状乳癌を生じさせることの実証により、基底状乳癌を特異的に治療するROR1標的療法の開発のための根拠が得られる。

【0199】

実施例5：新規な受容体チロシンキナーゼおよび多能性乳腺前駆細胞の制御

発癌性のNeuまたはH-Rasによって誘導されるヒトエストロゲン受容体(ER)陽性腫瘍およびマウス乳腺腫瘍は、分化した管腔起源に合致する細胞種マーカーを発現する(例えば、サイトケラチンK18/K19)。これに対して、悪性度の高いER陰性ヒト癌、およびWnt-1癌遺伝子によって誘発されるマウス腫瘍は、基底サイトケラチンK5、K17、K14および幹細胞抗原(Sca-1)を含め、細胞種マーカーに関してははるかに異種混交的なパターンを示す(例えば、Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003; 100: 15853-8を参照されたい)。これは、これらの乳癌における形質転換の標的となるのが多能性前駆細胞であるという見方に一致する。管腔系列および筋上皮系列の両方に分化し得る不死化前駆細胞が記載されている(例えば、Gudjonsson et al., Genes Dev. 2002; 16: 693-706; およびDeugnier et al., J Cell Biol. 2002; 159: 453-63を参照されたい)。

【0200】

ほとんどのヒト乳癌細胞株は均一な管腔マーカーを発現するものの、本発明者らは最近、K18/K19陽性細胞および平滑筋アクチン(SMA)陽性細胞の両方を生じる前駆細胞特性を備えた多数の悪性乳房細胞株を同定した。注目されることとして、本発明者らは、前駆細胞特性を備えた非悪性細胞系および癌細胞株がいずれもROR1受容体チロシンキナーゼを一貫して発現し、これに対して管腔乳腺細胞は検出可能な発現を伴わないことを見いだした。本発明者らはまた、基底/前駆細胞特性を備えた原発性ヒト乳癌のサブセットにおけるROR1の高レベル発現も見いだした。さらに、ROR1は細胞外frizzledドメインを介してwntリガンドと結合するかもしれない、これは前駆細胞を調節することが以前に示されているシグナル伝達経路とつながる可能性がある(例えば、Saldanha et al, Protein Sci. 1998; 7: 1632-5; およびBrittan et al., J Pathol. 2002; 197: 492.509を参照されたい)。

【0201】

ROR1の示唆に富む発現パターンと、幹細胞再生の決定的なメディエータとしての役割が確立しているWntリガンドとそれが結合するかもしれないという興味深い可能性とを合わせて考えることにより、本発明者らは、ROR1シグナル伝達が乳腺前駆細胞の増殖および/または自己再生の制御に関与するという仮説を立てるに至った。本発明者らはさらに、同様の前駆細胞特性を有する悪性細胞ははるかに高いROR1レベルを有するという理由から、細胞は悪性プログレッションの際にこの経路をアップレギュレートするのではないかという仮説を立てた。本明細書に提示した本開示は、ROR1受容体チロシンキナーゼを介したシグナル伝達が、多能性乳腺前駆細胞の増殖、自己再生および/または分化を制御するという仮説を検証することを可能にする。

【0202】

前駆細胞特性を備えた乳腺細胞におけるROR1サイレンシングがそれらの増殖、形態形成および/または分化能力に決定的な影響を及ぼすことの判定。

ROR1発現を、前駆特性を備えた非悪性細胞および悪性細胞におけるRNA干渉によってサイレンシングさせ、その影響を形態形成アッセイおよび腫瘍形成アッセイでアッセイすることができる。

ROR1受容体によるシグナル伝達の亢進が、管腔乳房細胞と比較して、乳腺上皮基底/前駆細胞を特異的に形質転換させるか否か、またはその悪性腫瘍を増加させるか否かの判定

10

20

30

40

50

。 基底/前駆細胞系および管腔細胞系の増殖および悪性能力に対するROR1の過剰発現または恒常的活性化の影響を比較することができる。

【0203】

例示的な方法：

ROR1のサイレンシングは、pSIREN-retroQレトロウイルス系(BD Clontech)を用いたhpRNA ROR1配列の安定的な発現によって実現することができる。野生型、恒常的活性化型、およびCRDまたはキナーゼドメインを欠く欠失変異体を含むROR1構築物の過剰発現をレトロウイルス感染(pLPCX; BD Clontech)を用いて実現し、最近作製されたROR1ポリクローナル抗体を用いてモニターすることができる。ROR1の欠失または過剰発現の影響は、インビトロのマトリゲルTDLU形成アッセイ(ヒト細胞)、除去した乳腺脂肪体におけるインビボ乳腺上皮再構成アッセイ(マウス細胞)およびインビボ異種移植片の腫瘍形成(悪性細胞)ならびに標準的な増殖アッセイを用いてアッセイすることができる。分化または細胞種の組成は、十分には解明されておらず、悪性度の高いER陰性基底状乳癌の特定のクラスの病因にとって極めて重要な可能性のある、乳腺幹細胞の増殖および分化を調節する特徴的マーカーを用いた免疫組織化学染色によって評価し得る。乳腺前駆細胞およびそれに由来する悪性細胞の増殖を制御する、ROR1受容体チロシンキナーゼを介したシグナル伝達は、Wnt-1により誘導されるマウス腫瘍がいかにして生じるかを説明する一助になり得ると考えられる。さらに、細胞表面受容体およびチロシンキナーゼの両者としてのROR1の特性からみて、これは特に魅力的な治療標的である。

10

20

【0204】

本出願の全体を通じて、さまざまな刊行物を参照してきた(例えば、括弧の中で)。これらの刊行物の開示内容は、その全体が参照として本明細書に組み入れられる。本出願におけるいくつかの特定の方法および材料は、米国特許第6,767,541号、第6,165,464号、第5,772,997号、第5,677,171号、第5,770,195号、第6,399,063号、第5,725,856号および5,720,954号(それらの内容は参照として本明細書に組み入れられる)に見られるものと類似している。

【0205】

本発明は、本発明の個々の局面の単なる例示であることを意図している、本明細書中に開示された諸態様によっては制限されず、機能的に等価な方法および組成物も本発明の範囲に含まれるものとする。当業者には、以上の説明および教示により、本明細書に記載したものに加えて、本発明のモデルおよび方法に対するさまざまな変更が明らかになると考えられ、それらも同様に本発明の範囲に含まれるものとする。このような変更および他の態様は、本発明の真の範囲および精神から逸脱することなしに実施することができる。

30

【0206】

(表1)ポリヌクレオチド配列

ヒト HER2 ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 3)

ATGGAGCTGGCGGCCCTTGTGCCGCTGGGGGCTCCTCCTCGCCCTCTTGC CCCCCGGAGCCGCGAGCACC
 CAAGTGTGCACCGGCACAGACATGAAGCTGCGGCTCCCTGCCAGTCCCAGACCCACCTGGACATGCTC
 CGCCACCTCTACCAGGGCTGCCAGGTGGTGCAGGGAAACCTGGAACCTCACTACCTGCCACCAATGCC
 AGCCTGTCTTCTGCAGGATATCCAGGAGGTGCAGGGCTACGTGCTCATCGCTACAACCAAGTGAGG
 CAGTCCCACCTGCAGAGGCTGCGGATTGTGCGAGGCCACCCAGCTCTTTGAGGACAACATGCCCCGGCC
 GTGCTAGACAATGGAGACCCGCTGAACAATAACCACCCCTGTACAGGGGCTCCTCCCAGGAGGCTGCGG
 GAGCTGCAGCTTCGAAGCCTCACAGAGATCTTGAAAGGAGGGGTCTTGA TCCAGCGGAACCCCCAGCTC
 TGCTACCAGGACACGATTTTGTGGAAGGACATCTTCCACAAGAACAACAGCTGGCTCTCACACTGATA
 GACACCAACCGCTCTCGGGCTGCCACCCCTGTTCTCCGATGTGTAAGGGCTCCCGCTGCTGGGGAGAG
 AGTTCTGAGGATTGTGAGAGCCTGACCGCAGCTGTCTGTGCGGGTGGCTGTGCCCCGCTGCAAGGGGCA
 CTGCCCACTGACTGCTGCCATGAGCAGTGTGCTGCCGGCTGCACGGGGCCCAAGCACTCTGACTGCCTG
 GCCTGCCTCCACTTCAACCACAGTGGCATCTGTGAGCTGCACTGCCAGCCCTGGTCACTACAACACA
 GACACGTTTGTAGTCCATGCCCAATCCCAGGGCCGGTATACATTCGGCC CAGCTGTGTGACTGCCCTGT
 CCCTACAACCTACCTTTCTACGGAGCTGGGATCCTGCACCCCTCGTCTGCC CCCTGCACAACCAAGAGGTG
 ACAGCAGAGGATGGAACACAGCGGTGTGAGAAGTGACAGCAAGCCCTGTG CCCCAGTGTGCTATGGTCTG
 GGCATGGAGCACTTGCAGAGGTTGAGGGCAGTTACCAGTGCCAATATCCAGGAGTTTGTGCTGGCTGCAAG
 AAGATCTTTGGGAGCCTGGCATTCTGCGGAGAGCTTTGATGGGGACC CAGCCTCCAACACTGCCCCG
 CTCCAGCCAGAGCAGCTCCAAGTGTGTTGAGACTCTGGAAGAGATCACAG GTTACCTATACATCTCAGCA
 TGGCCGGACAGCCTGCCTGACCTCAGCGTCTTCCAGAACCTGCAAGTAA TCCGGGGACGAATTCCTGCAC
 AATGGCGCTACTCGCTGACCTGCAAGGGCTGGGCATCAGCTGGCTGG GGTGCGCTCACTGAGGGAA
 CTGGGCAGTGGACTGGCCCTCATCCACCATAACACCCACCTCTGCTTCG TGACACCGGTGCCCTGGGAC
 CAGCTCTTTGCGAACCCGACCAAGCTCTGCTCCACTGCCAACCCGGC CAGAGGACGAGTGTGTGGGC
 GAGGGCCTGGCCTGCCACCAGCTGTGCGCCCCGAGGGCACTGCTGGGGTC CAGGGCCACCCAGTGTGTC
 AACTGCAGCCAGTTCTTCCGGGGCCAGGAGTGGTGGAGGAATGCCGAG TACTGCAGGGGCTCCCCAGG
 GAGTATGTGAATGCCAGGCACTGTTTGCCTGCCACCCTGAGTGTGAGC CCCAGAATGGCTCAGTGACC
 TGTTTTGGACCCGAGGCTGACCAGTGTGTGGCCTGTGCCACTATAAGG ACCCTCCCTTCTGCGTGGCC
 CGCTGCCCCAGCGGTGTGAAACCTGACCTCTCTACATGCCCATCTGGA AGTTTCCAGATGAGGAGGGC
 GCATGCCAGCCTTGCCCCATCAACTGCACCCACTCCTGTGTGGACCTGG ATGACAAGGGCTGCCCCGCC
 GAGCAGAGAGCCAGCCCTCTGACGTCCATCGTCTCTGCGGTGGTTGGCA TTCTGCTGGTCCGTGGTCTTG
 GGGTGGTCTTTGGGATCCTCATCAAGCGACGGCAGCAGAAGATCCGGA AGTACACGATGCGGAGACTG
 CTCCAGGAAACGGAGCTGGTGGAGCCGCTGACACCTAGCCGAGCGATGC CCAACCAGGCGCAGATGCGG
 ATCTGTAAAGAGAGACGGAGCTGAGGAAGGTGAAGGTGCTTGGATCTGGCG CTTTTGGCACAGTCTACAAG
 GGCATCTGGATCCCTGATGGGGAGAATGTGAAAATTCAGTGGCCATCA AAGTGTGAGGGAAAACACA
 TCCCCAAAGCCAACAAGAAATCTTAGACGAAGCATACTGTATGGCTG GTGTGGGCTCCCCATATGTC
 TCCCGCCTTCTGGGCATCTGCCTGACATCCACGGTGCAGCTGGTGCAC AGCTTATGCCCTATGGCTGC
 CTCTTAGACCATGTCCGGGAAAACCGCGGACGCTGGGCTCCAGGACC TGCTGAACTGGTGTATGCAG
 ATTGCCAAGGGGATGAGCTACCTGGAGGATGTGCGGCTCGTACACAGGG ACTTGGCCGCTCGGAACGTG
 CTGGTCAAGAGTCCCAACCATGTCAAATTACAGACTTCGGGCTGGCTC GGCTGCTGGACATTGACGAG
 ACAGAGTACCATGCAGATGGGGGCAAGGTGCCCATCAAGTGGATGGCGC TGGAGTCCATTCTCCGCCG
 CGTTTACCCACCAGAGTGTGTGGAGTTATGGTGTGACTGTGTGGG AGCTGATGACTTTTGGGGCC
 AAACCTTACGATGGGATCCCAGCCCGGAGATCCCTGACCTGCTGGAAA AGGGGGAGCGGCTGCCCCAG
 CCCCCCATCTGCACCATTTGATGTCTACATGATCATGGTCAAATGTTGGA TGATTGACTCTGAATGTGCG
 CCAAGATTCCGGGAGTTGGTGTCTGAATTCCTCCGCATGGCCAGGGACC CCCAGCGCTTTGTGGTCACT
 CAGAATGAGGACTTTGGGCCAGCCAGTCCCTTGGACAGCACCTTCTACC GCTCACTGCTGGAGGACGAT
 GACATGGGGGACCTGGTGGATGCTGAGGAGTATCTGGTACCCAGCAGG GCTTCTTCTGTCCAGACCCT
 GCCCCGGGCGCTGGGGGATGGTCCACCACAGGCACCGCAGCTCATCTA C CAGGAGTGGCGGTGGGGAC
 CTGACACTAGGGCTGGAGCCCTCTGAAGAGGAGGCCCCAGGTCTCCAC TGGCACCCCTCCGAAGGGGCT
 GGCTCCGATGTATTTGATGGTGAACCTGGGAATGGGGGACAGCAAGGGGC TGCAAAGCCTCCCCACACAT
 GACCCAGCCCTCTACAGCGGTACAGTGAGGACCCACAGTACCCCTGCC CTCTGAGACTGATGGCTAC
 GTTGGCCCCCTGACCTGCAGCCCCAGCCTGAATATGTGAACCAGCCAG ATGTTCCGGCCCCAGCCCCCT
 TCGCCCCGAGAGGGCCCTCTGCCTGCTGCCCGACCTGCTGGTGCACCT CTGGAAAGGGCCAAGACTCTC
 TCCCCAGGGAAGAATGGGGTCTGCAAAGACGTTTTTGCCTTTGGGGGTG CCGTGGAGAACCCCGAGTAC
 TTGACACCCAGGGAGGAGCTGCCCTCAGCCCCACCTCCTCCTGCCTT CAGCCAGCCCTTCGACAAC
 CTCTATTACTGGGACCAGGACCCACCAGAGCGGGGGCTCCACCCAGCACCTTCAAAGGGACACCTACG
 GCAGAGAACCAGAGTACCTGGGCTGGACGTGCCAGTG SEQ ID NO: 3

10

20

30

40

ヒト EGFR ポリヌクレオチド配列

(SEQ ID NO: 4)

CCGGCGCAGCGCGGCCGCGAGCAGCCTCCGCCCCCGCACGGTGTGAGCGCCCGCCGCGGCGGAGGCGGC
CGGAGTCCCGAGCTAGCCCCGGCGGCCGCCGCCAGACCGGACGACAGGCCACCTCGTCCGGCGTCC
GCCCCGAGTCCCCGCTCGCCGCCAACGCCACAACCACCGCGCACGGCCCCCTGACTCCGTCCAGTATTG
ATCGGGAGAGCCCGAGCGAGCTCTTCGGGGAGCAGCGATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCT
CCTGGCGCTGCTGGCTGCGCTCTGCCCGGCGAGTCGGGCTCTGGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGGCAC
GAGTAACAAGCTCACGCAGTTGGGCACTTTTGAAGATCATTTTTCTCAGCCTCCAGAGGATGTTCAATAA
CTGTGAGGTGGTCCTTGGGAATTTGGAAATTACCTATGTGCAGAGGAATTATGATCTTTCCTTCTTAAA
GACCATCCAGGAGGTGGCTGGTTATGTCCTCATTTGCCCTCAACACAGTGGAGCGAATTCCTTTGGAAAA
CCTGCAGATCATCAGAGGAAATATGTACTACGAAAATTCCTATGCCTTAGCAGTCTTACTTAACATATGA
TGCAAAATAAAACCGGACTGAAGGAGCTGCCCATGAGAAATTTACAGGAAATCCTGCATGGCGCCGTGCG
GTTTACGCAACAACCTGCCCTGTGCAATGTGGAGAGCATCCAGTGGCGGGACATAGTCAAGCAGTGA
TCTCAGCAACATGTTCGATGGACTTCCAGAACCACCTGGGCAGCTGCCAAAAGTGTGATCCAAGCTGTCC
CAATGGGAGCTGCTGGGGTGCAGGAGAGGAGAACTGCCAGAACTGACCAAAATCATCTGTGCCAGCA
GTGCTCCGGGCGCTGCCGTGGCAAGTCCCCCAGTGACTGCTGCCACAACCAGTGTGCTGCAGGCTGCAC
AGGCCCCGGGAGAGCGACTGCCCTGGTCTGCCGCAAATTCGAGACGAAGCCACGTGC AAGGACACCTG
CCCCCACTCATGCTCTACAACCCACCACGTACCAGATGGATGTGAACCCCGAGGGCAAATACAGCTT
TGGTGCCACCTGCGTGAAGAAGTGTCCCGTAATTTATGTGGTGACAGATCACGGCTCGTGCCTCCGAGC
CTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTAAAGAAGTGC GAAGGGCTTG
CCGCAAAGTGTGTAACGGAATAGGTATTTGGTGAATTTAAAGACTCACTCTCCATAAATGCTACGAATAT
TAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCTCCACATCCTGCCGGTGGCA TTTAGGGGTGA
CTCCTTACACATACTCCTCCTCTGGATCCACAGGAACCTGGATATTCTGAAAACCGTA AAGGAAATCAC
AGGTTTGGAGCTGAATTATCACATGAATATAAATGGGAAATCAGTGTTTTAGAGAGAGA ACTTTTCGACA
TATTTCTGTTCCTTGGAAATAAAAACATTTCTTCTGAAATTTTACCGTTAA

ヒト VEGF ポリヌクレオチド配列

(SEQ ID NO: 5)

AAGAGCTCCAGAGAGAAGTCGAGGAAGAGAGACGGGGTCAGAGAGAGCGCGGGGC GTGCGAGCAGC
GAAAGCGACAGGGGCAAAGTGAGTGACCTGCTTTTGGGGGTGACCGCCGGAGCGCGGC GTGAGCCCTCC
CCCTTGGGATCCCGCAGCTGACCAGTTCGCGCTGACGGACAGACAGACAGACACCGCCC CCAGCCCAGT
TACCACCTCCTCCCCGGCCGGCGGCGGACAGTGGACCGCGCGGCGAGCCGCGGGCAGG GGCCGGAGCCC
GCCCCGGAGCGGGGTGGAGGGGTCGGAGCTCGCGGGCTCGCACTGAAACTTTTCG TCCAACCTCTG
GGCTGTTCTCGCTTCGGAGGAGCCGTGGTCCGCGCGGGGAAGCCGAGCCGAGCGGGAG CCGCGAGAAGT
GCTAGCTCGGGCCGGGAGGAGCCGCAGCCGGAGGAGGGGGAGGAGGAAGAAGAGAAGG AAGAGGAGAGG
GGGCCGAGTGGCGACTCGGCGCTCGGAAGCCGGGCTCATGGACGGGTGAGGGCGGCGG TGTGCGCAGAC
AGTGCTCCAGCGCGCGCTCCCCAGCCCTGGCCCCGGCTCGGGCCGGGAGGAAGAGT AGCTCGCCGAG
GCGCCGAGGAGAGCGGGCCGCCCCACAGCCCGAGCCGGAGAGGGACGCGAGCCGCGCG CCCCAGTCCGG
CCTCCGAAACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCTTGTCT CTACCTCCACC
ATGCCAAGTGGTCCAGGCTGCACCCATGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAATCATCACGA AGTGGTGAAGT
TCATGGATGTCTATCAGCGCAGCTACTGCCATCCAATCGAGACCCTGGTGGACATCTT CAGGAGTACC
CTGATGAGATCGAGTACATCTTCAAGCCATCCTGTGTGCCCTGATGCGATGCGGGGG CTGCTCCAATG
ACGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGTCCAACATCACCATGCAGATTATGCG GATCAAACCTC
ACCAAGGCCAGCACATAGGAGAGATGAGCTTCCTACAGCACAAACAATGTGAATGCAG ACCAAAGAAAG
ATAGAGCAAGACAAGAAAATCCCTGTGGGCCTTGCTCAGAGCGGAGAAAGCATTGTT TGTACAAGATC
CGCAGACGTGTAATGTTCCCTGCAAAAACACACACTCGCGTTGCAAGGCGAGGCAGCT TGAGTTAAACG
AACGTACTTGCAGATGTGACAAGCCGAGGCGGTGAGCCGGGCAGGAGGAAGGAGCCTC CCTCAGGGTTT
CGGGAACCAGATCTCTCCTCCAGGAAAGACTGATACAGAACGATCGATACAGAAACCAC GCTGCCGCCAC
CACACCATCACCATCGACAGAACAGTCCTTAATCCAGAAACCTGAAATGAAGGAAGAG GAGACTCTGCG
CAGACACTTTGGGTCCGGAGGGCGAGACTCCGGCGAAGCATTCCCGGGCGGGTGACC CAGCACGGTC
CCTCTTGGAAATTGGATTTCGCCATTTTATTTTTCTTGTGCTAAATCACCGAGCCCGGA ZGATTAGAGAG
TTTTATTTCTGGGATTCCCTGTAGACACACCCACCCACATAACATAATTTATATATATA TATATTATATA
TATATAAAAATAAATATCTCTATTTTTATATATATAAATATATATATTTCTTTTTTAA ZTTAACAGTGC
TAATGTTATTGGTGTCTTCACTGGATGTATTTGACTGCTGTGGACTTGAGTTGGGAGGGGAATGTTCCC
ACTCAGATCCTGACAGGGAAGAGGAGGAGATGAGAGACTCTGGCATGATCTTTTTTTTGTCCC ACTTGG
TGGGGCCAGGGTCCCTCCCCCTGCCAAGAATGTGCAAGGCCAGGGCATGGGGGCAAATATGACCCAGT
TTTGGGAACACCCGACAAACCCAGCCCTGGCGCTGAGCCTCTCTACCCAGGTCAGACGGACAGAAAGAC
AAATCACAGGTTCCGGGATGAGGACACCGGCTCTGACCAGGAGTTTGGGGAGCTTCAGGACATTGCTGT
GCTTTGGGGATTCCCTCCACATGCTGCACGCGCATCTCGCCCCAGGGGCACTGCCTGGAAGATT CAGG
AGCCTGGGCGGCCCTTCGCTTACTCTCACCTGCTTCTGAGTTGCCAGGAGGCCACTGGCAGATGTCCC G
GCGAAGAGAAGAGACACATTGTTGGAAGAAGCAGCCCATGACAGCGCCCCCTTCTGGGACTCGCCCTCA
TCCTCTTCTGCTCCCCCTTCTTGGGTGCAGCCTAAAAGGACCTATGTCTCACACCATTGAAACCACT
AGTTCCTGTCCCCCAGGAAACCTGGTTGTGTGTGTGTGAGTGGTTGACCTTCTCCATCCCCCTGGTCTT
TCCCTTCCCTTCCCGAGGCACAGAGAGACAGGGCAGGATCCACGTGCCCATTTGTTGGAGGCAGAGAAAAG
AGAAAGTGTTTTATATACGGTACTTATTTAATATCCCTTTTTTAATTAGAAATTAGAACAGTTAATTTAA
TTAAAGAGTAGGGTTTTTTTTTTCAGTATTCCTGGTTAATATTTAATTTCAACTATTTATGAGATGTATCT
TTTGCTCTCTTGTCTCTTATTTGTACCGTTTTTTGTATATAAAATTCATGTTTCCAATCTCTCTCT
CCCTGATCGGTGACAGTCACTAGCTTATCTTGAACAGATATTTAATTTTGTAACTCAGCTCTGCC C
TCCCCGATCCCCTGGCTCCCCAGCACACATTCCTTTGAAAGAGGGTTTCAATATACATCTACATACTAT
ATATATATATGGGCAACTTGTATTTGTGTGTATATATATATATATATATATATGTTTATGTATATATGTGATCCTG
AAAAAATAAACATCGCTATTCGTTTTTTTATATGTTCAAACCAAACAAGAAAAAATAGAGAATTCTACA
TACTAAATCTCTCTCCTTTTTTAATTTTAATATTTGTTATCATTATTTATTTGGTGTACTGTTTATCC
GTAATAATGTGGGGAAAAGATATTAACATCACGTCTTTGTCTCTAGTGCAGTTTTTTCGAGATATTCG
TAGTACATATTTATTTTTAAACAACGACAAAGAAATACAGATATATCTTA

10

20

30

ヒト FLT FMS 様 チロシンキナーゼ-3 (FLT3) ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 6)

CGAGGCGGCATCCGAGGGCTGGGCCGGCGCCCTGGGGGACCCCGGGCTCCGGAGGCCATGCCGGCGTTG
GCGCGCGACGCGGGCACCCTGCCGCTGCTCGTTGTTTTTCTGCAATGATATTTGGGACTATTACAAAT
CAAGATCTGCCCTGTGATCAAGTGTGTTTTAATCAATCATAAGAACAATGATTCATCAGTGGGGAAGTCA
TCATCATATCCCATGGTATCAGAATCCCAGGAAAGACCTCGGGTGTGCGTTGAGACCCAGAGCTCAGGG
ACAGTGTACGAAGCTGCCGCTGTGGAAGTGGATGTATCTGCTTCCATCACACTGCAAGTGTGGTTCGAT
GCCCCAGGGAACATTTCCCTGTCTCTGGGTCTTTAAGCACAGCTCCCTGAATTGCCAGCCACATTTTGAT
TTACAAAACAGAGGAGTTGTTTCCATGGTCATTTTGAAAATGACAGAAACCCAAGCTGGAGAATACCTA
CTTTTTATTCAGAGTGAAGCTACCAATTACACAATATTGTTTACAGTGAGTATAAGAAATACCCCTGCTT
TACACATTAAGAAGACCTTACTTTAGAAAAATGGAAAACAGGACGCCCTGGTCTGCATATCTGAGAGC
GTTCCAGAGCCGATCGTGGAAATGGGTGCTTTTGCATTACAGGGGGAAAGCTGTAAAGAAGAAAAGTCCA
GCTGTTGTTAAAAAGGAGGAAAAAGTGTTCATGAATTAATTTGGGACGGACATAAGGTGCTGTGCCAGA
AATGAACTGGGCAGGGAATGCACCAGGCTGTTTACAATAGATCTAAATCAAACCTCAGACCCATTTG
CCACAATTAATTTCTTAAAGTAGGGGAACCCCTTATGGATAAGGTGCAAAAGCTGTTTCATGTGAACCATGGA
TTTCGGGCTCACCTGGGAATTTAGAAAAACAAAGCACTCGAGGAGGGCAACTACTTTGAGATGAGTACCTAT
TCAACAAAACAGAACTATGATACGGATTTCTGTTTGTCTTTGTATCATCAGTGGCAAGAAACGACACCGGA
TACTACACTTGTTCCTCTTCAAAGCATCCAGTCAATCAGCTTTGGTTACCATCGTAGGAAAGGGATTT
ATAAATGCTACCAATTCAAGTGAAGATTATGAAATGACCAATATGAAGAGTTTGTTTTTTCTGTGACGG
TTTAAAGCCTACCCACAAATCAGATGTACGTGGACCTTCTCTCGAAAATCATTTCCTTGTGAGCAAAAAG
GGTCTTGATAACGGATACAGCATATCCAAGTTTTGCAATCATAAGCACCAGCCAGGAGAATATATATTC
CATGCAGAAAATGATGATGCCAATTTACCAAAATGTTTACGCTGAATATAAGAAGGAAACCTCAAGTG
CTCGCAGAAGCATCGGCAAGTCAAGCGTCTGTTTCTCGGATGGATAACCCATTACCATTCTGGACCTGG
AAGAAGTGTTCAGACAAGTCTCCCAACTGCACAGAAGAGATCACAGAAGGAGTCTGGAATAGAAAGGCT
AACAGAAAAGTGTGGACAGTGGGTGTGAGCAGTACTCTAAACATGAGTGAAGCCATAAAAAGGGTTC
CTGGTCAAGTGTGTGCATACAATTCCTTGGCACATCTTGTGAGACGATCCTTTTAAACTCTCCAGGC
CCCTTCCCTTTCATCCAAGACAACATCTCATTCTATGCAACAATTGGTGTGTCTCCTCTTCATTGTC
GTTTTAACCCTGCTAATTTGTGTCACAAGTACAAAAGCAATTTAGGTATGAAAGCCAGCTACAGATGGTA
CAGGTGACCCGCTCCTCAGATAATGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAAGAGAAATGAAATATGATCTCAA
TGGGAGTTTCCAAGAGAAAAATTTAGAGTTTGGGAAGGTACTAGGATCAGGTGCTTTTGGAAAAGTGATG
AACGCAACAGCTTATGGAATTAGCAAAACAGGAGTCTCAATCCAGGTTGCCGTCAAATGCTGAAAGAA
AAAGCAGACAGCTCTGAAAGAGAGGCACCTCATGTGAGAATCAAGATGATGACCCAGCTGGGAAGCCAC
GAGAATATTTGTAACCTGTGTTGGGGCGTGCACACTGTGAGGACCAATTTACTTTGATTTTGAATACTGT
TGCTATGGTGATCTTCTCAACTATCTAAGAAGTAAAAGAGAAAAATTTACAGGACTTGGACAGAGATT
TTCAAGGAACACAATTTTCAAGTTTACCCCACTTCTCAATCACATCCAAATTCAGCATGCCTGGTTCA
AGAGAAGTTCAGATACCCCGACTCGGATCAAATCTCAGGGCTTCATGGGAATTCATTTCACTCTGAA
GATGAAATTTGAATATGAAAACAAAAAAGGCTGGAAGAAGAGGAGGACTTGAATGTGCTTACATTTGAA
GATCTTCTTTGCTTTGTCATATCAAGTTGCCAAAGGAATGGAATTTCTGGAATTTAAGTGTGTTTAC
AGAGACCTGGCCCGCAGGAACGTGCTTGTCAACCCAGGGAAAGTGGTGAAGATATGTGACTTTGGATTG
GCTCGAGATATCATGAGTGAATTTCAACTATGTTGTGAGGGCAATGCCCGTCTGCCTGTAAAATGGATG
GCCCCGAAAAGCCTGTTTGAAGGCATCTACACCATTAAGAGTGAATGTTGCTGATATGGAATATTACTG
TGGGAAATCTTCTCACTTGGTGTGAATCCTTACCCTGGCATTCCGGTTGATGCTAACTTCTACAAACTG
ATTCAAAATGGATTTAAAATGGATCAGCCATTTTATGCTACAGAAGAAATATACATTATAATGCAATCC
TGCTGGGCTTTTACTCAAGGAAACGGCCATCCTTCCCTAATTTGACTTCGTTTTTAGGATGTCAGCTG
GCAGATGCAGAAGAAGCGATGTATCAGAATGTGGATGGCCGTGTTTCGGAATGTCTCACACCTACCAA
AACAGGCGACCTTTCAGCAGAGAGATGGATTTGGGGCTACTCTCTCCGACGGCTCAGGTGGAAGATTCC
TAGAGGAACAATTTAGTTTTAAGGACTTTCATCCCTCCACCTATCCCTAACAGGCTGTAGATTACCAAAA
CAAGATTAATTTTCACTCAAAAAGAAATCTATTATCAACTGCTGCTTACCAGACTTTTCTCTAGAAG
CCGTCTGCGTTTTACTCTGTTTTTCAAAGGGACTTTTTGTAAAATCAAATCATCCTGTCAAAAGGCAGGAG
GAGCTGATAATGAACTTTATTGGAGCATTGATCTGCATCCAAGGCCTTCTCAGGCCGGCTTGAGTGAAT
TGTTGACCTGAAGTACAGTATATCTTGTAAATACATAAAAACAAAAGCATTTTGCTAAGGAGAAGCTAA
TATGATTTTTTAAGTCTATGTTTTAAAATAATATGTAAATTTTTTCACTATTTAGTATATATTTTATG
GGTGGGAATAAAATTTCTACTACAG

10

20

30

ヒト MYC ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 7)

AAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCAGGGCACCAGGCTTAGATGTGGCTCTTTGGGGAGATAATTTTC
TCCAGAGACCTTTCTAACGTATTCATGCCTTGTATTTGTACAGCATTAATCTGGTAATTGATTATTTTA
ATGTAACCTTGTCTAAAGGAGTGATTTCTATTTCTTTCTTAAAGAGGAGGAACAAGAAGATGAGGAAGA
AATCGATGTTGTTTCTGTGAAAAAGAGGCAGGCTCCTGGCAAAGGTCAGAGTCTGGATCACCTTCTGC
TGGAGGCCACAGCAAACCTCCTCACAGCCCACTGGTCCCTCAAGAGGTGCCACGTCTCCACACATCAGCA
CAACTACGCAGCGCCTCCCTCCACTCGGAAGGACTATCCTGCTGCCAAGAGGGTCAAGTTGGACAGTGT
CAGAGTCTGAGACAGATCAGCAACAACCGAAAAATGCACCAGCCCCAGGTCCTCGGACACCGAGGAGAA
TGTCAAGAGGGCGAACACACAACGTCTTGGAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCTAAAACGGAGCTTTTTTTC
CCTGCGTGACCAGATCCCAGGAGTTGAAAAACAATGAAAAGGCCCCCAAGGTAGTTATCCTTAAAAAAGC
CACAGCATAACATCCTGTCCGTCCAAGCAGAGGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGTTCGGAA
ACGACGAGAACAGTTGAAACACAACTTGAACAGCTACGGAACCTTGTGCGTAAGGAAAAGTAAGGAA
AACGATTCCTTCTAACAGAAATGTCTGAGCAATCACCTATGAACCTGTTTCAAATGCATGATCAAATG
CAACTCACAACTTGGCTGAGTCTTGGAGCTGAAAGATTTAGCCATAATGTAAACTGCCTCAAATTTGG
ACTTTGGGCATAAAAGAAGCTTTTTTATGCTTACCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTAAACAGATTTGTATTTAAG
AATTGTTTTTAAAAAATTTTAAAGATTTACACAATGTTTCTCTGTAAATATTGCCATTAAATGTAAATAA
CTTTAATAAAAACGTTTATAGCAGTTACACAGAAATTTCAATCCTAGTATATAGTACCTAGTATTATAGGT
ACTATAAACCCCTAATTTTTTTTTTATTTAAGTACATTTTGTCTTTTTTAAAGTTGATTTTTTTCTATTGTTT
TAGAAAAAATAAAATAACTGGCAAATATATCAATGAGCCAAATCTTAAGTTGTGAATGTTTTGTTTCGT
TTCTTCCCCCTCCCAACCACCACCATCCCTGTTTGTCTTTCATCAATTGCCCTTCAGAGGGTGGTCTTA
AGAAAGGCAAGAGTTTTCTCTGTGAAATGGGTCTGGGGGCCCTTAAGGTCTTTAAGTTCTTGGAGGT
CTAAGATGCTTCTGGAGACTATGATAACAGCCGAAGTTGACAGTTAGAAGGAATGGCAGAAGGCAGGT
GAGAAGGTGAGAGGTAGGCAAAGGAGATACAAGAGGTCAAAGGTAGCAGTTAAGTACACAAGAGGCAT
AAGGACTGGGGAGTTGGGAGGAAGGTGAGGAAGAACTCCTGTTACTTTAGTTAACAGTGCCAGTCCC
CTGCTCACTCCAAA

10

ヒトウロキナーゼプラスミノーゲンアクチベーター (UPA) ポリヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 8)

CCCCGGCCAGGGTCCACCTGTCCCCGCAGCGCCGGCTCGCGCCCTCCTGCCGCAGCCACCGAGCCGCCG
TCTAGCGCCCCGACCTCGCCACCATGAGAGCCCTGCTGGCGCGCCTGCTTCTCTGCGTCTCTGGTCTGTGA
GGCATCCAAAGGCAGCAATGAACCTTCATCAAGTTCCATCGAACTGTGACTGTCTAAATGGAGGAACAT
GTGTGTCCAACAAGTACTTCTCCAACATTCCTGCTGCAACTGCCCAAAGAAATTCGGAGGGCAGCACT
GTGAAATAGATAAGTCAAAAACCTGCTATGAGGGGAATGGTCACTTTTACCGAGGAAAGGCCAGCACTG
ACACCATGGGCGGCCCTGCCCTGCCCAGCACTGTCCTTCCAGCAAACGTACCATGCCACAC
GATCTGATGCTCTTACAGTGGGCTGGGGAACATAAATTACTGCAGGAACCCAGACAACCGGAGGCGAC
CCTGGTGCTATGTGCAGGTGGGCCATAAGCCGCTTGTCCAAGAGTGCATGGTGCATGACTGCGCAGATG
GAAAAAAGCCCTCCTCTCCTCCAGAAGAATTAATAATTTAGTGTGGCCAAAAGACTCTGAGGCCCCGCT
TTAAGATTTATGGGGGAGAATTCACCACCATCGAGAACCAGCCCTGGTTTTGCGGCCATCTACAGGAGGC
ACCGGGGGGGCTCTGTACCTACGTGTGTGGAGGCAGCCCTCATCAGCCCTTGTCTGGGTGATCAGCGCCA
CACACTGCTTCAATTGATTACCCAAAGAAGGAGGACTACATCGTCTACCTGGGTGCTCAAGGCTTAACT
CCAACAGCAAGGGGAGATGAAGTTTGAGGTGGAACCTCATCCTACACAAGGACTACAGCGCTGACA
CGCTTGCTCACCACAACGACATTTGCCCTTGTGTAAGATCCGTTCCAAGGAGGGCAGGTGTGCGCAGCCAT
CCCCGACTATACAGACCATCTGCCCTGCCCTCGATGTATAACGATCCCCAGTTTGGCACAAGCTGTGAGA
TCACTGGCTTTGAAAAAGAGAATTTACCGACTATCTCTATCCGGAGCAGCTGAAAATGACTGTTGTGA
AGCTGATTTCCACCGGGAGTGTGAGCAGCCCACTACTACGGCTCTGAAGTCACCACCAAATGCTGT
GTGCTGCTGACCCACAGTGGAAAACAGATTCCTGCCAGGGAGACTCAGGGGGACCCCTCGTCTGTTCCC
TCCAAGGCCGATGACTTTGACTGGAATTTGTGAGCTGGGGCCGTGGATGTGCCCTGAAGGACAAGCCAG
GCGTCTACACGAGAGTCTCACACTTCTTACCTGGATCCGCAGTCACACCAAGGAAGAGAATGGCCTGG
CCCTCTGAGGGTCCCAGGGAGGAAACGGGCACCCCGCTTCTTGTGCTGGTTGTCAATTTTGCAGTAG
AGTCATCTCCATCAGCTGTAAGAAGAGACTGGGAAGATAGGCTCTGCACAGATGGATTTGCCTGTGCCA
CCCACCAGGGTGAACGACAATAGCTTTTACCTCAGGCATAGGCCCTGGGTGCTGGCTGCCAGACCCCTC
TGGCCAGGATGGAGGGTGGTCTGACTCAACATGTTACTGACCAGCAACTTGTCTTTTTTCTGGACTGA
AGCCTGCAGGAGTTAAAAGGGCAGGGCATCTCCTGTGCATGGGTGAAGGGAGAGCCAGCTCCCCGAC
GGTGGGCATTTGTGAGGCCATGTTGAGAAATGAATAATTTCCCAATTAGGAAGTGAACAGCTGAGG
TCTCTTGAGGGAGCTTAGCCAATGTGGGAGCAGCGTTTTGGGGAGCAGAGACACTAACGACTTCAGGGC
AGGGCTCTGATATTCATGAATGTATCAGGAAATATATATGTGTGTGTATGTTTGCACACTTGTGTGTG
GGCTGTGAGTGTAAAGTGTGAGTAAGAGCTGGTGTCTGATTTGTTAAGTCTAAATATTTCTTAAACTGTG
TGGACTGTGATGCCACAGAGTGGTCTTTCTGGAGAGGTTATAGGTCACCTCCTGGGGCCTCTTGGGCTC
CCCCAGTGACAGTGCCTGGGAATGTATTATTCTGCAGCATGACCTGTGACCAGCACTCTCAGTTTC
ACTTTCACATAGATGTCCCTTTCTTGGCCAGTTATCCCTTCCCTTTTAGCCTAGTTTCAATCCATCCTCAC
TGGGTGGGGTGGAGACCACCTTACACTGAATATTTATATTTCACTATTTTTATTTATTTTTGTAA
TTTTAAATAAAAAGTGATCAATAAAATGTGATTTTTTCTGATGAA

20

30

40

ヒトプラスミノーゲンアクチベーターインヒビター (PAI-1) ポリヌクレオチド配列

SEQ ID NO: 9)

GAATTCCTGCAGCTCAGCAGCCGCCAGAGCAGGACGAACCCGCAATCGCAAGGCACCTCTGAGAAC
TTCAGGATGCAGATGTCTCCAGCCCTCACCTGCCTAGTCCTGGGCCTGGCCCTTGTCTTTGGTGAAGGG
TCTGCTGTGCACCATCCCCATCCTACGTGGCCACCTGGCCTCAGACTTCGGGGTGAGGGTGTTCAG
CAGGTGGCGCAGGCCTCCAAGGACCGCAACGTGGTTTTCTCACCTATGGGGTGGCCTCGGTGTGGCC
ATGCTCCAGCTGACAACAGGAGGAGAAACCCAGCAGCAGATTCAGCAGCTATGGGATTCAAGATTGAT
GACAAGGGCATGGCCCCGCCCTCCGGCATCTGTACAAGGAGCTCATGGGGCCATGGAACAAGGATGAG
ATCAGCACCACAGACCGATCTTCGTCCAGCGGGATCTGAAGCTGGTCCAGGGCTTCATGCCCCACTTC
TTCAGGCTGTTCCGGAGCACGGTCAAGCAAGTGGACTTTTCAGAGGTGGAGAGAGCCAGATTCATCATC
AATGACTGGGTGAAGACACACACAAAAGGTATGATCAGCAACTTGCTTGGGAAAGGAGCCGTGGACCAG
CTGACACGGCTGGTGTGGTGAATGCCCTCTACTTCAACGGCCAGTGGAAAGACTCCCTTCCCCGACTCC
AGCACCACCCGCCCTCTTCCACAAATCAGACGGCAGCACTGTCTCTGTGCCATGATGGCTCAGACC
AACAAAGTTCAACTATACTGAGTTCACACGCCCGATGGCCATTACTACGACATCCTGGAAC TGCCCTAC
CACGGGGACACCCTCAGCATGTTTCATTGCTGCCCTTATGAAAAAGAGGTGCCTCTCTCGCCCTCACC
AACATTCTGAGTGGCCAGCTCATCAGCCACTGGAAAGGCAACATGACCAGGCTGCCCGCCCTCTGGTT
CTGCCCAAGTTCTCCCTGGAGACTGAAGTCGACCTCAGGAAGCCCTAGAGAACCCTGGGAATGACCGAC
ATGTTTCAGACAGTTTCAGGCTGACTTCAGGAGTCTTTTCAGACCAAGAGCCTCTCCACGTGCGCAGGGC
CTGCAGAAAGTGAAGATCGAGGTGAACGAGAGTGGCACGGTGGCCTCTCATCCACAGCTGTCTATAGTC
TCAGCCCGCATGGCCCCGAGGAGATCATCATGGACAGACCCTTCTCTTTGTGGTCCGGCACAACCCC
ACAGGAACAGTCTTTTTTCATGGGCCAAGTGATGGAACCCCTGACCCTGGGGAAAGACGCCTTCATCTGGG
ACAAAAC TGAGATGCATCGGGAAAGAAGAACTCCGAAGAAAAGAAATTTAGTGTTAATGACTCTTTTC
TGAAGGAAGAGAAGACATTTGCCTTTTGTAAAAGATGGTAAACCAGATCTGTCTCCAAGACCTTGCC
TCTCCTTGAGGACCTTTAGGTCAAACCTCCTAGTCTCCACCTGAGACCTGGGAGAGAAGTTTGAAGC
ACAACCTCCCTTAAGGTCTCAAACCAGACGGTGCACGCTGCGGGACCATCTGGGGCACCTGCTTCCACC
CGTCTCTCTGCCACTCGGGTCTGCAGACCTGGTTCCCACTGAGGCCCTTTGCAGGATGGAAC TACGGG
GCTTACAGGAGCTTTTGTGTGCCTGGTAGAACTATTTCTGTTCCAGTCACATTGCCATCACTCTTGTA
CTGCCCTGCCACCGCGGAGGAGGCTGGTGCAGGCCAAAGGCCAGTGGAAAGAAACACCCTTTTCATCTCAG
AGTCCACTGTGGCACTGGCCACCCCTCCCCAGTACAGGGGTGCTGCAGGTGGCAGAGTGAATGTCCCC
ATCATGTGGCCCAACTCTCCTGGCCTGGCCATCTCCCTCCCCAGAAAAGTGTGCATGGGTATTTTGG
AGTGTAGGTGACTTGTTTACTCATTGAAGCAGATTTCTGCTTCTCTTTATTTTATAGGAATAGAGGAA
GAAATGTCAGATGCGTGCAGCTCTTCCACCCCAATCTTTGGTGGGGAGGGGTGTACCTAAATATTT
TATCATATCCTTGCCCTTGAGTGCTTGTTAGAGAGAAAGAGAACTACTAAGGAAAATAATATTTAA
ACTCGCTCCTAGTGTTTCTTTGTGGTCTGTGTACCGTATCTCAGGAAGTCCAGCCACTTGACTGGCAC
ACACCCCTCCGGACATCCAGCGTGACGGAGCCCACTGCCACCTTGTGGCCGCTGAGACCCCTCGCGC
CCCCCGCCCCCGCGCCCTCTTTTCCCCTTGATGGAAATTGACCATACAAATTTTCATCTCTCTCA
GGGATCAAAGGACGGAGTGGGGGACAGAGACTCAGATGAGGACAGAGTGGTTTCCAATGTGTTCAA
TAGATTTAGGAGCAGAAATGCAAGGGGCTGCATGACCTACCAGGACAGAACTTTCCCAATTACAGGGT
GACTCACAGCCGATTTGGTGACTCACTTCAATGTGTCAATTTCCGGCTGCTGTGTGTGAGCAGTGGACAC
GTGAGGGGGGGTGGGTGAGAGAGACAGGCAGCTCGGATTCAACTACCTTAGATAAATATTTCTGAAAAC
CTACCAGCCAGAGGGTAGGGCACAAGATGGATGTAATGCACCTTGGGAGGCCAAGGCGGGAGGATTGC
TTGAGCCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACATAACCAAGACCCCGTCTCTTTAAAAATATATATA
TTTTAAATATACTTAAATATATATTTCTAATATCTTTAAATATATATATATATTTTAAAGACCAATTTA
TGGGAGAAATGCACACAGATGTGAAATGAATGTAATCTAATAGAAGC

10

20

30

ヒト BRCA1 ポリヌクレオチド配列

(SEQ ID NO: 10)

AAAAC TGC GACTGCGCGGCGTGAGCTCGCTGAGACTTCC TGGACCCCGCACCAGGCTGTGGGGT TTTCTC
AGATAACTGGGCCCCCTGCGCTCAGGAGGCC T T CACCCTCTGCTCTGGGTAAAGTTCA TTGGAACAGAAA
GAAATGGATTTATCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGTACAAAATGTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTA
GAGTGTCCCATCTGTCTGGAGTTGATCAAGGAACCTGTCTCCACAAAGTGTGACCACATATTTGCAAA
TTTTGCATGCTGAAACTTCTCAACCAGAAGAAAGGGCC T T CACAGTGTCTTTATGTAAGAATGATATA
ACCAAAAGGAGCCTACAAGAAAGTACGAGATTTAGTCAACTTGT TGAAGAGCTATTGAAAAATCATTTGT
GCTTTTCAGCTTGACACAGGTTTGGAGTATGCAAACAGCTATAATTTTGCAAAAAGGAAAAATAACTCT
CCTGAACATCTAAAAGATGAAGTTTCTATCATCCAAAGTATGGGCTACAGAAACCGTGCCAAAAGACTT
CTACAGAGTGAACCCGAAAATCCTTCC T TGCAGGAAACAGTCTCAGTGTCCAAC TCTCTAACCTTGGGA
ACTGTGAGAACTCTGAGGACAAAGCAGCGGATACAACCTCAAAGACGTCTGTCTACATTGAATTTGGGA
TCTGATTCTTCTGAAGATACCGTTAATAAGGCAACTTAT TGCAGTGTGGGAGATCAAGAATTTGTACAA
ATCACCCCTCAAGGAAC CAGGGATGAAATCAGTTTGGATTCTGCAAAAAGGCTGCTTGTGAATTTTCT
GAGACGGATGTAACAAATAC TGAACATCATCAACCCAGTAATAATGATTTGAAACACC ACTGAGAAGCGT
GCAGCTGAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCTGTTTCAAAC T TGCATGTGGAGCCATGTGGC
ACAAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGAACAGCAGTTTAT TACTCACTAAAGACAGAATGAAT
GTAGAAAAGGCTGAATTTCTGTAATAAAAAGCAAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGG
GCTGGAAGTAAGGAAACATGTAATGATAGCGGACTCCCAGCACAGAAAAAAGG TAGATCTGAATGCT
GATCCCCCTGTGTGAGAGAAAAGAATGGAATAAGCAGAAAC T GCCATGCTCAGAGAATCCTAGAGATACT
GAAGATGTTCTTGGATAACACTAAATAGCAGCATTCAGAAAGTTAATGAGTGGTTTTCCAGAAAGTGAT
GAACTGTTAGGTTCTGATGACTCACATGATGGGGAGTCTGAATCAAATGCCAAAGTAGCTGATGTATTG
GACGTTCTAAATGAGGTAGATGAATATTTCTGGTTCTT CAGAGAAAATAGACTTACTGGCCAGTGATCCT
CATGAGGCTTTAATATGTAAAAGTGAAGAGTTCACTCCAATCAGTAGAGAGTAATATTGAAGACAAA
ATATTTGGGAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAGCCTCCCAACTTAAGCCATGTA ACTGAAAATCTAAT
ATAGGAGCATTTGTTACTGAGCCACAGATAATACAAGAGCGTCCCCTCACAAATAAAT TAAAGCGTAAA
AGGAGACCTACATCAGGCC T T CATCCTGAGGATTTTATCAAGAAAGCAGATTTGGCAGTTCAAAGACT
CCTGAAATGATAAATCAGGGAAC TAACCAAACGGAGCAGAATGGTCAAGTGAATATTACTAATAGT
GGTCATGAGAATAAAACAAAAGGTGATTCTATT CAGAATGAGAAAATCCTAACCCAATAGAACTACTC
GAAAAAGAATCTGCTTTCAAACGAAAGCTGAACCTATAAGCAGCAGTATAAGCAATATGGAAC TCGAA
TTAAATATCCCAATTCAAAAGCACCTAAAAGAATAGGCTGAGGAGGAAGTCTTCTACCAGGCATATT
CATGCGCTTGAAC TAGTAGT CAGTAGAAATCTAAGCCACCTAATTTG TACTGAATTGCAAATGATAGT
TGTTCTAGCAGTGAAGAGATAAAGAAAAAAGTACAACCAAATGCCAGT CAGGCACAGCAGAAAACCTA
CAACTCATGGAAGGTAAGAACCTGCAACTGGAGCCAAGAAGAGTAA CAAGCCAAATGAACAGACAAGT
AAAAGACATGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGTTAACAAATGCACCTGGTTCTTTTACTAAGTGT
TCAAATACCAGTGAAC T TAAAGAATTTGTCAATCCTAGCCTTCCAAGAGAAGAAAAAGAAGAGAACTA
GAAACAGTTAAAGTGTCTAATAATGCTGAAGACCCCAAAGATCTCATGTTAAGTGGAGAAAGGGTTT T G
CAAAC T GAAAAGATCTGTAGAGAGTAGCAGTATTTT CATTGGTACCTGGTACTGATTATGGCACTCAGGAA
AGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCAAAAACAGAACCAAATAAATGTGTGAGTCAG
TGTGCAGCATTTGAAAACCCCAAGGACTAATTCATGGTTGTTCCAAAGATAATAGAAATGACACAGAA

10

20

GGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGAAGTTAACCACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAGT
 GAACTTGATGCTCAGTATTTGCAGAATACATTTCAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTTGCTCCGTTTTC
 AATCCAGGAAATGCAGAAAGGAAATGTGCAACATTCCTGCCCCTCTGGGTCTTAAAGAAACAAAAGT
 CCAAAGTCACTTTTGAATGTGAACAAAAGGAAAGAAATCAAGGAAAGAATGAGTCTAATATCAAGCCT
 GTACAGACAGTTAATATCACTGCAGGCTTCCCTGTGGTTGGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCC
 AAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGGTTTTGTCTATCATCTCAGTTTCAGAGGCAACGAAACTGGACTC
 ATTACTCCAAATAAACATGGACTTTTACAAAACCCATATCGTATACCACCCTTTTCCCATCAAGTCA
 TTTGTTAAAACTAAATGTAAGAAAAATCTGCTAGAGGAAAACCTTGGAGAACATTCATGTACCTGAA
 AGAGAAATGGGAAATGAGAACATTCCAAGTACAGTGAGCACAATTAGCCGTAATAACATTAGAGAAAAAT
 GTTTTTAAAGAAGCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGT
 ATTAATGAAATAGGTTCCAGTGATGAAAACATTCAGCAGAACTAGGTAGAAACAGAGGGCCAAAATTG
 AATGCTATGCTTAGATTAGGGGTTTTGCAACCTGAGGTCTATAAACAAAGTCTTCTGGAAGTAATTTGT
 AAGCATCTGAAATAAAAAAGCAAGAATATGAAGAAGTAGTTTCAGACTGTTAATACAGATTTCTCTCCA
 TATCTGATTTTCAGATAACTTAGAACAGCCTATGGGAAGTAGTCATGCATCTCAGGTTTGTCTGAGACA
 CCTGATGACCTGTTAGATGATGTTGAAATAAAGGAAGATACTAGTTTTGCTGAAAATGACATTAAGGAA
 AGTTCTGCTGTTTTTAGCAAAGCGTCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAGGAGTCTAGCCCTTTCACCCAT
 ACACATTTGGCTCAGGTTTACCGAAGAGGGGCCAAGAAATTAGAGTCTCAGAAGAGAACTTATCTAGT
 GAGGATGAAGAGCTTCCCTGCTTCCAACACTTGTATTTGGTAAAGTAAACAATATACCTTCTCAGTCT
 ACTAGGCATAGCACCTTGTCTACCGAGTGTCTGTCTAAGAACACAGAGGAGAATTTATTATCATTGAAG
 AATAGCTTAAATGACTGCAGTAACCAGGTAATATTTGGCAAAGGCATCTCAGGAACATCACCTTAGTGAG
 GAAACAAAATGTTCTGCTAGCTTGTTCCTTCCAGTGCAGTGAATTTGGAAGACTTGACTGCAAAATACA
 AACACCCAGGATCTTCTTGTATGGTTCTTCCAACAATGAGGCATCAGTCTGAAAGCCAGGGAGTT
 GGTCTGAGTGACAAGGAATTTGGTTTCAGATGATGAAGAAAGAGGAACGGGCTTGAAGAAAATAATCAA
 GAAGAGCAAAGCATGGATTCAAACCTTAGGTGAAGCAGCATCTGGGTGTGAGAGTGAACAAGCGTCTCT
 GAAGACTGCTCAGGCTATCCTCTCAGAGTGACATTTAACCCTCAGCAGAGGGATAACCATGCAACAT
 AACCTGATAAAGCTCCAGCAGGAAATGGCTGAACTAGAAGCTGTGTTAGAACAGCATGGGAGCCAGCCT
 TCTAACAGCTACCTTCCATCATAAGTGACTCTTCTGCCCTTGGAGACTGCGAAATCCAGAACAAGC
 ACATCAGAAAAAGCAGTATTAACCTTCAAGAAAAGTAGTGAATACCCTATAAGCCAGAATCCAGAAGGC
 CTTTCTGCTGACAAGTTTGGAGTGTCTGCAGATAGTTCTACCAGTAAAAATAAAGAACCAGGAGTGGAA
 AGGTCATCCCCTTCAAATGCCCATCATTAGATGATAGGTGGTACATGCACAGTTGCTCTGGGAGTCTT
 CAGAATAGAACTACCCATCTCAAGAGGAGCTCATTAAAGTTGTTGATGTGGAGGAGCAACAGCTGGAA
 GAGTCTGGGCCACAGATTTGACGGAACATCTTACTTGCCTAAGGCAAGATCTAGAGGGAACCCCTTAC
 CTGGAATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCAGAG
 TCAGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCAATTGAAAGTTGCAGAA
 TCTGCCCAGAGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATAATGCAATGGAAGAAAGTGTG
 AGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGGGTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCT
 GGCCTGACCCGAGAAGAAATTTATGCTCGTGTACAAGTTTGCAGAAAACACCACATCACTTTAACTAAT
 CTAATTTACTGAAGAGACTACTCATGTTGTTATGAAAACAGATGCTGAGTTTGTGTGTGAACGGACACTG
 AAATATTTCTAGGAAATGCGGGAGGAAAATGGGTAGTTAGCTATTTCTGGGTGACCCAGTCTATTTAA
 GAAAGAAAAATGCTGAATGAGCATGATTTTGAAGTCAAGAGGAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCACAA
 GGTCCAAAAGCGAGCAAGAGAATCCAGGACAGAAAGATCTTCAAGGGGCTAGAAAATCTGTTGCTATGGG
 CCCTTACCAACATGCCACAGATCAACTGGAATGGATGGTACAGCTGTGTGGTGTCTTGTGGTGAAG
 GAGCTTTCATCATTACCCCTTGGCACAGGTGTCCACCCAATTGTGGTTGTGCAGCCAGATGCCTGGACA
 GAGGACAATGGCTTCCATGCAATTTGGGCAGATGTGTGAGGCACCTGTGGTGACCCGAGAGTGGGTGTTG
 GACAGTGTAGCACTCTACCAGTGCCAGGAGCTGGACACCTACCTGATAACCCAGATCCCCCACAGCCAC
 TACTGACTGCAGCCAGCCACAGGTACAGAGCCCAGGACCCCAAGAATGAGCTTACAAAGTGGCCTTTCC
 AGGCCCTGGGAGCTCCTCTCCTCTCCTCTACTCTCTACTGCTGCTGGCTACTAAATATTTATGTACATC
 AGCCTGAAAAGGACTTCTGGCTATGCAAGGGTCCCTTAAAGATTTTCTGCTTGAAGTCTCCTTGGAAA
 TCTGCCATGAGCACAAAATTTATGGTAATTTTTTACCTGAGAAGATTTTAAAACCATTTAAAACGCCACCA
 ATTGAGCAAGATGCTGATTCATTTATTTATCAGCCCTATTCTTTCTATTTCAGGCTGTTGTTGGCTTAGGG
 CTGGAAGCACAGAGTGGCTTGGCCTCAAGAGAATAGCTGGTTTTCCCTAAGTTTACTTCTCTAAAACCT
 GTGTTCAAAAGGCAGAGAGTCAGACCCCTTCAATGGAAGGAGAGTCTTGGGATCGATTATGTGACTTA
 AAGTCAGAAATAGTCTTGGGCAGTTCTCAAATGTTGGAGTGGAAACATTGGGGAGGAAATTTCTGAGGCAG
 GTATTAGAAAATGAAAAGGAACTTGAACCTGGGCATGGTGGCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGG
 GAGGCCAAGGTGGGCAGATCACTGGAGGTCAGGAGTTCGAAACCAGCCTGGCCAACATGGTGAAACCCC
 ATCTCTACTAAAAATACAGAAATTAGCCGGTCAATGGTGGTGGACACCTGTAATCCCAGTACTCAGGTG
 GCTAAGGCAGGAGAATCACTTACGCCGGGAGGTGGAGGTTGCAGTGAGCCAAGATCATAACCACGGCAC
 TCCAGCCTGGGTGACAGTGTGGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGAAAATGAAACTAGGAAAG
 GTTTCTTAAAGTCTGAGATATATTTGCTAGATTTCTAAAGAATGTGTTCTAAAACAGCAGAAGATTTTC
 AAGAACCAGGTTTCAAAGACAGTCTTCTAATTCCTCAATTAGTAATAAGTAAAATGTTTATTTGTGTAGC
 TCTGGTATATAATCCATTTCTTAAAATAAAGACCTCTGGCATGAATATTTTATATCTATAAAAATGA
 CAGATCCCACAGGAAGGAAAGCTGTTGCTTTCTTTGAGGTGATTTTTTCTTTGCTCCTTGTGCTGA
 AACCATACAGCTTCATAAATAATTTGCTTGCTGAAGGAAGAAAAGTGTTTTTTATAAAACCCATTATC
 CAGGACTGTTTATAGCTGTTGGAAGGACTAGGTCTTCCCTAGCCCCCAGTGTGCAAGGGCAGTGAAG
 ACTTGATTGTACAAAATACGTTTTGTAAATGTTGTGCTGTTAACACTGCAAATAAACTTGGTAGCAAAC
 A

10

20

30

40

ヒト BRCA2 ポリヌクレオチド配列

(SEQ ID NO: 11)

GGTGGCGCGAGCTTCTGAAACTAGGCGGCAGAGGCGGAGCCGCTGTGGCACTGCTGCGCCTCTGCTGCG
CCTCGGGTGTCTTTTTCGCGCGGTGGGTTCGCCGCCGGGAGAGCGTGGAGGGGACAGATTTGTGACCGGCG
CGGTTTTTGTTCAGCTTACTCCGGCCAAAAAGAAGTGCACCTCTGGAGCGGACTTATTTACCAAGCATT
GGAGGAATATCGTAGGTAAAAATGCCTATTGGATCCAAAGAGAGGGCCAAACATTTTGTGAAATTTTTAAG
ACACGCTGCAACAAAGCAGATTTAGGACCAATAAGTCTTAATTGGTTTGAAGAAGCTTTCTTCAGAAGCT
CCACCCCTATAATTCTGAACCTGCAGAAGAATCTGAACATAAAAAACAACAATTACGAACCAAACCTATTT
AAAACTCCACAAAGGAAACCATCTTATAATCAGCTGGCTTCAACTCCAATAATATTCAAAGAGCAAGGG
CTGACTCTGCCGCTGTACCAATCTCCTGTAAAAGAATTAGATAAATTCAAATTAGACTTAGGAAGGAAT
GTTCCCAATAGTAGACATAAAAAGTCTTCGCACAGTGAAAAGTAAAATGGATCAAGCAGATGATGTTTCC
TGTCCACTTCTAAATTTCTTGTCTTAGTGAAAAGTCTGTTGTTCTACAATGTACACATGTAACACCACAA
AGAGATAAGTTCAGTGGTATGTGGGAGTTTGTTCATACACCAAAGTTTGTGAAGGGTTCGTCAGACACCA
AAACATATTTCTGAAAGTCTAGGAGCTGAGGTGGATCCTGATATGTCTTGGTCAAGTTCTTTAGCTACA
CCACCCACCCCTTAGTTCTACTGTGCTCATAGTCAGAAATGAAGAAGCATCTGAAACTGTATTTCCATCAT
GATACTACTGCTAATGTGAAAAGCTATTTTTCCAATCATGATGAAAAGTCTGAAGAAAAATGATAGATTT
ATCGCTTCTGTGACAGACAGTGAAAACACAAATCAAAGAGAAGCTGCAAGTCATGGATTTGGAAAAACA
TCAGGGAATTCATTTAAAGTAAATAGCTGCAAAGACCACATTGGAAAGTCAATGCCAAATGTCCTAGAA
GATGAAGTATATGAAACAGTTGTAGATACCTCTGAAGAAGATAGTTTTTTCATTATGTTTTTCTAAATGT
AGAACAAAAATCTACAAAAAGTAAGAAGTACGAAAGTACGAAAAGTAAATTTCCATGAAGCAAACGCT
GATGAATGTGAAAAATCTAAAAACCAAGTGAAGAAAAATACTCATTTGTATCTGAAGTGAACCAAAT
GATACTGATCCATTAGATTCAAATGTAGCACATCAGAAGCCCTTTGAGAGTGGAAAGTGACAAAATCTCC
AAGGAAGTTGTACCCCTTTTGGCCTGTGAATGGTCTCAACTAACCCCTTTGAGGTCTAAATGGAGCCAG
ATGGAGAAAAATACCCCTATTGCATATTTCTTCATGTGACCAAAATATTTTCAGAAAAAGACCTATTAGAC
ACAGAGAACAAAAAGAAAGAAAGATTTTTCTTACTTCAGAGAATTTCTTTGCCACGTATTTCTAGCCTACCA
AAATCAGAGAAGCCATTAATGAGGAAACAGTGGTAAATAAGAGAGATGAAGAGCAGCATCTTGAATCT
CATAACAGACTGCATTTCTGTCAGTAAAGCAGGCAATATCTGGAACCTTCTCCAGTGGCTTCTTCAATTCAG
GGTATCAAAAAGTCTATATTCAGAATAAGAGAATCACCTAAAGAGACTTTCAATGCAAGTTTTTTCAGGT
CATATGACTGATCCAACTTTTAAAAAGAAACTGAAGCCTCTGAAAAGTGGACTGGAAATACATACTGTT
TGCTCACAGAAGGAGGACTCCTTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACA
CAGAATTTCTGTAGCTTTGAAGAATGCAGGTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAAACAAATAAGTTTTATT
TATGCTATACATGATGAAACATTTTATAAAGGAAAAAAAATACCGAAAGACCAAAAATCAGAACATAATT
AACTGTTTCAGCCAGTTTGAAGCAAATGCTTTTGAAGCACCCTTACATTTGCAAATGCTGATTCAGGT
TTATTGCATTTCTTCTGTGAAAAGAAGCTGTTTACAGAATGATTCTGAAGAACCACCTTTGTCTTTAACT
AGCTCTTTTGGGACAATTTCTGAGGAAATGTTCTAGAAATGAAACATGTTCTAATAATACAGTAATCTCT
CAGGATCTTGATTATAAAGAAGCAAAATGTAATAAGGAAAAACTACAGTTATTTATTACCCAGAAAGCT
GATTCTCTGTTCATGCCCTGCAGGAAGGACAGTGTGAAAATGATCCAAAAAGCAAAAAGTTTTTCAGATATA
AAAGAAGAGGTTCTTGGCTGCAGCATGTCCACCCAGTACAACATTCAAAAGTGGAAATACAGTGATACAGT
TTTCAATCCCAGAAAAGTCTTTTATATGATCATGAAAATGCCAGCACTCTTATTTTAACTCCTACTTCC
AAGGATGTTCTGTCAAACCTAGTCATGATTTCTAGAGGCAAAGAATCATACAAAATGTCAGACAAGCTC
AAAGGTAAACAAATATGAATCTGATGTTGAATTAACCAAAAATATTCATGGAAGAAATCAAGATGTA
TGTGCTTTAAATGAAAATTATAAAAACGTTGAGCTGTTGCCACCTGAAAAATACATGAGAGTAGCATCA
CCTTCAAGAAAGGTACAATTCACCAAAAACACAAATCTAAGAGTAATCAAAAAAATCAAGAAGAACT
ACTTCAATTTCAAAAATAACTGTCAATCCAGACTCTGAAGAAGTTTTCTCAGACAATGAGAATAATTTT
GCTTTCCAAGTAGCTAATGAAAGGAATAATCTTGCTTTAGGAAATACTAAGGAAGTTTCATGAAACAGAC
TTGACTTGTGTAACGAACCCATTTTCAAGAAGTCTACCATGGTTTTATATGGAGACACAGGTGATAAA
CAAGCAACCCAGTGTCAATTAAAAAAGATTTGGTTTTATGTTCTTGCAGAGGAGAACAAAAATAGTGTA

10

20

30

AAGCAGCATATAAAAAATGACTCTAGGTCAAGATTTAAAAATCGGACATCTCCTTGAATATAGATAAAAATA
 CCAGAAAAAAATAATGATTACATGAACAAATGGGCAGGACTCTTAGGTCCAATTTCAAATCACAGTTTTT
 GGAGGTAGCTTCGAACAGCTTCAAATAAGGAAATCAAGCTCTCTGAACATAACATTAAGAAGAGCAAA
 ATGTTCTTCAAAGATATTGAAGAACAATATCCTACTAGTTTAGCTTGTGTTGAAAATTGTAATACTCTG
 GCATTAGATAATCAAAGAAACTGAGCAAGCCTCAGTCAATTAATACTGTATCTGCACATTTACAGAGT
 AGTGTAGTTGTTTCTGATTGTAATAAATAGTCATATAACCCCTCAGATGTTATTTTCCAAGCAGGATTTT
 AATTCAAACCATAAATTTAACACCTAGCCAAAAGGCAGAAAATTACAGAACTTTCTACTATATTAGAAGAA
 TCAGGAAGTCAGTTTGAATTTACTCAGTTTGAAGAAACCAAGCTACATATTGCAGAAGAGTACATTTGAA
 GTGCCTGAAAACCAGATGACTATCTTAAAGACCCTTCTGAGGAATGCAGAGATGCTGATCTTCATGTC
 ATAATGAATGCCCCATCGATTGGTCAAGGTAGACAGCAGCAAGCAATTTGAAGGTACAGTTGAAATTTAA
 CGGAAGTTTGGCTGGCCTGTTGAAAATGACTGTAACAAAAGTGCTTCTGGTTATTTAACAGATGAAAAT
 GAAGTGGGGTTTTAGGGGCTTTTATTCTGCTCATGGCACAAAACCTGAATGTTTCTACTGAAGCTCTGCAA
 AAAGCTGTGAAAACGTTTGTAGTATATTGAGAATATTAGTGAGGAAACTTCTGCAGAGGTACATCCAATA
 AGTTTATCTCAAGTAAATGTCATGATTCTGTTGTTTCAATGTTTAAAGATAGAAAATCATAATGATAAA
 ACTGTAAGTGAATAAATAAATAATGCCAAGTATATTACAAAATAATTTGAAAATGACTACTGGCAGT
 TTTGTTGAAGAAAATTACTGAAAATTACAAGAGAAAATACTGAAAATGAAGATAACAAAATACTGCTGCC
 AGTAGAAAATFCTCATAACTTAGAATTTGATGGCAGTGATTCAAGTAAAAATGATACTGTTTGTATTCAT
 AAAGATGAAACGGACTTGCTATTTACTGATCAGCACAAACATATGTCTTAAATTTATCTGGCCAGTTTATG
 AAGGAGGGAAACACTCAGATTAAGAAGATTTGTCAGATTTAACTTTTTTGAAGTTGCGAAAGCTCAA
 GAAGCATGTCATGGTAATACTTCAAATAAAGAACAGTTAACTGCTACTAAAACGGAGCAAAATATAAAA
 GATTTTGAAGACTTCTGATACATTTTTTTCAGACTGCAAGTGGGAAAAATATTAGTGTGCGCCAAAGAGTCA
 TTTAATAAAAATTTGTAATTTCTTTGATCAGAAAACAGAAATTTGCATAACTTTTCTTAAATTTCTGAA
 TTACATCTGCATAAAGAAAGAACAAAATGGACATTTAAGTTATGAGGAAACAGACATGTTAAACAC
 AAAATACTGAAAAGAAAGTGTCCAGTTGGTACTGGAAAATCAACTAGTGACCTTCCAGGGACAACCCGAA
 CGTGATGAAAAGATCAAAGAACCTACTCTGTTGGGTTTTTCATACAGCTAGCGGGAAAAAAAGTTAAAAT
 GCAAAGGAATCTTTGGACAAAGTGA AAAACCTTTTTGATGAAAAGAGCAAGGTACTAGTGAAATCACC
 AGTTT TAGCCATCAATGGGCAAAGACCCTAAAGTACAGAGAGGCCTGTAAAGACCTTGAATTAGCATGT
 GAGACCATTGAGATCACAGCTGCCCAAAGTGTAAGAAAATGCAGAATTTCTCTCAATAATGATAAAAAC
 CTTGTTTCTATTGAGACTGTGGTGGCCACCTAAGCTCTTAAAGTGATAATTTATGTAGACAAAACGAAAAT
 CTCAAAACATCAAAAAGTATCTTTTTGAAAGTTAAAGTACATGAAAATGTAGAAAAAGAAAACAGCAAAA
 AGTCTTGCAACTTGTACACAAATCAGTCCCCTTATTAGTCAATGAAAATTCAGCCTTAGCTTTTTTAC
 ACAAGTTGTAGTAGAAAAAATCTGTGAGTCAGACTTCAATTAAGTTGAAGCAAAAAAATGGCTTAGAGAA
 GGAATATTGATGGTCAACCAGAAAGAATAAATACTGCAGATTATGTAGGAAAATTTATTTGTATGAAAAT
 AATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAATCATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTATTTAAGT
 AACAGTAGCATGTCCTAACAGCTATTCTTACCATTCTGATGAGGTATATAATGATTCAGGATATCTCTCA
 AAAATAAATTTGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTT
 TCCAAAAGTAAATATCCAATGTAAGATGCAAAATGCATACCCACAAAACCTGTAATGAAGATATTTGCGTT
 GAGGAACTTGTGACTAGCTCTTACCCTGCAAAAATAAAAATGCAGCCATTAATTTGTCATATCTAAT
 AGTAATAATTTTGAGGTAGGGCCACCTGCATTTAGGATAGCCAGTGGTAAAAATCGTTTGTGTTTACAT
 GAAACAATTA AAAAGTAAAGACATATTTACAGACAGTTTTCAGTAAAGTAATTAAGGAAAACAACGAG
 AATAAATCAAAAATTTGCCAAACGAAAATTTATGGCAGGTTGTTACGAGGCATTTGGATGATTCAGAGGAT
 ATTTCTTACATAACTCTCTAGATAATGATGAATGTAGCACGCATTCACATAAGGTTTTTGTGACATTCAG
 AGTGAAGAAAATTTTACAACATAACCAAAAATATGTCTGGATTGGAGAAAGTTTCTAAAATATCACCTTGT
 GATGTTAGTTTGGAACTTCAGATATATGTAATGTAGTATAGGGAAGCTTCATAAGTCAGTCTCATCT
 GCAAATACTTGTGGGATTTTTAGCACAGCAAGTGGAAAATCTGTCCAGGTATCAGATGCTTTCATTACAA
 AACGCAAGACAAGTGTTTTCTGAAAATAGAAGATAGTACCAAGCAAGTCTTTTCCAAAGTATTTGTTTAA
 AGTAACGAACATTCAGACCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTGCTATACGTACTCCAGAACATTTAATA
 TCCCAAAAAGGCTTTTTCATATAATGTGGTAAATTCATCTGCTTTCTCTGGATTTAGTACAGCAAGTGG
 AAGCAAGTTTCCATTTTAGAAAAGTTCTTACACAAAAGTTAAGGGAGTGTAGAGGAATTTGATTTAATC
 AGAACTGAGCATAGTCTTCACTATTACCTACGTCTAGACAAAATGTATCAAAAATACTTCTCCTGTT
 GATAAGAGAAACCCAGAGCACTGTGTAACCTCAGAAAATGGAAAAACCTGCAGTAAAGAAATTTAATTA
 TCAAATAACTTAAATGTTGAAGGTGGTTCTTTCAGAAAATAATCACTCTATTAAAGTTTCTCCATATCTC
 TCTCAATTTCAACAAGACAAACAACAGTTGGTATTAGGAACCAAAGTCTCACTTGTGAGAACATTCAT
 GTTTTGGGAAAAGAACAGGCTTACCTAAAACGTA AAAATGGAAAATTTGGTAAAACCTGAACTTTTTTCT
 GATGTTCTGTGAAAACAAATATAGAAGTTTGTCTACTTACTCCAAAGATTCAGAAAACCTACTTTGAA
 ACAGAAGCAGTAGAAAATGCTAAAGCTTTTATGGAAGATGATGAACTGACAGATTTCTAACTGCCAAGT
 CATGCCACACATTTCTTTTTTACATGTCCCGAAAATGAGGAAATGGTTTTGTCAAATTCAGAATTTGGA

10

20

30

40

AAAAGAAGAGGAGAGCCCCTTATCTTAGTGGGAGAACCCCTCAATCAAAAGAACTTATTTAAATGAATTT
 GACAGGATAATAGAAAATCAAGAAAAATCCTTAAAGGCTTCAAAAAGCACTCCAGATGGCACAATAAAA
 GATCGAAGATTGTTTATGCATCATGTTTCTTTAGAGCCGATTACCTGTGTACCCTTTTCGCACAATAAG
 GAACGTCAAGAGATACAGAATCCAAATTTTACCGCACCTGGTCAAGAATTTCTGTCTAAATCTCATTTG
 TATGAACATCTGACTTTGGAAAAATCTTCAAGCAATTTAGCAGTTTCAGGACATCCATTTTATCAAGTT
 TCTGTCTACAAGAAATGAAAAATGAGACACTTGATTACTACAGGCAGACCAACCAAAGTCTTTGTTCCA
 CCTTTTAAAACATAATCACATTTTCACAGAGTTGAACAGTGTGTTAGGAATATTAACCTGGAGGAAAAAC
 AGACAAAAGCAAAACATTGATGACATGGCTCTGATGATAGTAAAAATAAGATTAATGACAATGAGATT
 CATCAGTTTAAACAAAAACAACCTCCAATCAAGCAGCAGCTGTAACCTTTCACAAAAGTGTGAAGAAGACCT
 TTAGATTTAATTACAAGTCTTCAGAATGCCAGAGATATACAGGATATGCGAATTAAGAAGAAACAAAGG
 CAACGCGTCTTTCCACAGCCAGGCAGTCTGTATCTTGCAAAAACATCCACTCTGCCTCGAATCTCTCTG
 AAAGCAGCAGTAGGAGGCCAAGTTCCTCTGCGTGTCTCATAAACAGCTGTATACGTATGGCGTTTCT
 AAACATTTGCATAAAAAATTAACAGCAAAAATGCAGAGTCTTTTCAGTTTCACACTGAAGATTATTTTGGT
 AAGGAAAGTTTATGGACTGGAAAAGGAATACAGTTGGCTGATGGTGGATGGCTCATAACCTCCAATGAT
 GGAAAGGCTGGAAAAGAAGAAATTTTATAGGGCTCTGTGTGACACTCCAGGTGTGGATCCAAAGCTTATT
 TCTAGAATTTGGGTTTATAATCACTATAGATGGATCATATGGAACTGGCAGCTATGGAATGTGCCTTT
 CCTAAGGAATTTGCTAATAGATGCCAAGCCAGAAAAGGGTGTCTTTCAACTAAAATACAGATATGAT
 ACGGAAATTTGATAGAAGCAGAAGATCGGCTATAAAAAAGATAATGGAAAGGGATGACACAGCTGCAAAA
 ACACTTGTCTCTGTGTTTCTGACATAATTTTATTGAGCGCAAATATATCTGAAACTTCTAGCAATAAA
 ACTAGTAGTGCAGATACCCAAAAAGTGGCCATTATTGAACCTACAGATGGGTGGTATGCTGTTAAGGCC
 CAGTTAGATCCTCCCCTCTTAGCTGTCTTAAAGAATGGCAGACTGACAGTTGGTCAGAAGATTATTTCTT
 CATGGAGCAGAACTGGTGGGCTCTCCTGATGCCGTGTACACCTCTTGAAGCCCCAGAATCTCTTATGTTA
 AAGATTTCTGTCAACAGTACTCGGCTGTCTGCTGTTATACCAAACCTTGGATTCTTTCTGACCTTAGA
 CCTTTTCTCTGCCCCATCATCGCTTTTTCAGTGTAGGGAGGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATT
 CAAAGAGCATAACCTATACAGTGGATGGAGAAGACATCATCTGGATTATACATATTTTCGCAATGAAAGA
 GAGGAAGAAAAGGAAGCAGCAAAATATGTGGAGGCCAACAAAAGAGACTAGAAGCCTTATTACTAAA
 ATTCAGGAGGAATTTGAAGAACATGAAGAAAACACAACAAAACCATATTTACCATCACGTGACTAACA
 AGACAGCAAGTTTCGTGCTTTGCAAGATGGTGCAGAGCTTTATGAAGCAGTGAAGAATGCAGCAGACCCA
 GC'TTACCTTGAGGGTTATTTTCAGTGAAGAGCAGTTAAGAGCCTTGAATAATCACAGGCAAATGTTGAAT
 GATAAGAAACAAGCTCAGATCCAGTTGGAATTAGGAAGGCCATGGAATCTGCTGAACAAAAGGAACAA
 GG'TTTTCAAGGGATGTCACAACCGTGTGGAAGTTGCGTATTGTAAGCTATTCAAAAAAGAAAAAGAT
 TCAGTTATACTGAGTATTTGGCGTCCATCATCAGATTTATATTCTCTGTTAACAAGGAAAGAGATAC
 AGAATTTATCATCTTGCAACTTCAAAATCTAAAAGTAAATCTGAAAGAGCTAACATACAGTTAGCAGCG
 ACAAAAAAACTCAGTATCAACAACCTACCGGTTTCAGATGAAATTTTATTTTACAGATTTACCAGCCACGG
 GAGCCCCCTTCACTTACGCAAAATTTTATAGATCCAGACTTTTACGCCATCTTGTCTGAGGTGGACCTAATA
 GGATTTGTGCTTTCTGTGTGTAACAAAACAGGACTTGCCCCCTTTCGTCTATTTGTCAGACGAATGTTAC
 AATTTACTGGCAATAAAGTTTGGATAGACCTTAATGAGGACATTATTAAGCCTCATATGTTAATTGCT
 GCAAGCAACCTCCAGTGGCGACCAGAATCCAAATCAGGCCTTCTTACTTTATTTGCTGGAGATTTTCT
 GTGTTTTCTGCTAGTCCAAAAGAGGGCCACTTTCAAGAGACATTCACAAAATGAAAAATACTGTTGAG
 AATATTGACATACTTTGCAATGAAGCAGAAAACAAGCTTATGCATATACTGCATGCAAAATGATCCCAAG
 TGGTCCACCCAACTAAAGACTGTACTTTCAGGGCCGTACACTGCTCAAATCATTCTGGTACAGGAAAC
 AAGCTTCTGATGTCTTCTCCTAATTGTGAGATATATTATCAAAGTCTTTTATCACTTTGTATGGCCAAA
 AGGAAGTCTGTTTCCACACCTGTCTCAGCCAGATGACTTCAAAGTCTTGTAAAGGGGAGAAAGAGATT
 GATGACCAAAAAGAACTGCAAAAAGAGAAGAGCCTTGGATTTCTTGAGTAGACTGCCTTTACCTCCACCT
 GTTAGTCCCATTGTTACATTTGTTTCTCCGGCTGCACAGAAGGCATTTTACGCCACCAAGGAGTTGTGGC
 ACCAAATACGAAACACCCATAAAGAAAAAAGAACTGAATTTCTCCTCAGATGACTCCATTTAAAAAATTC
 AATGAAATTTCTCTTTTGGAAAGTAATTC AATAGCTGACGAAGAACTTGCATTGATAAAATACCCAAGCT
 CTTTTGTCTGGTTCAACAGGAGAAAAACAATTTATATCTGTGAGTGAATCCACTAGGACTGCTCCCACC
 AGTTTCAGAAGATTATCTCAGACTGAAACGACGTTGTACTACATCTCTGATCAAAGAACAGGAGAGTTCC
 CAGGCCAGTACGGAAGAATGTGAGAAAAATAAGCAGGACACAATTAACAATAAAAAATATATCTAAGCA
 TT'TGCAAAGGCGACAATAAATATTGACGCTTAACCTTTCCAGTTTATAAGACTGGAATATAATTTCAA
 ACCACACATTAGTACTTATGTTGCACAATGAGAAAAGAAATAGTTTCAAATTTACCTCAGCGTTTGTG
 TATCGGGCAAAAATCGTTTGGCCGATTCGGTATTGGTATACTTTTGTCTTCAAGTTGCATATCTTAAAC
 TAAATGTAATTTATTAATAATCAAGAAAAACATCTTTGGCTGAGCTCGGTGGCTCATGCCTGTAATCC
 CAACACTTTGAGAAGCTGAGGTGGGAGGAGTGCTTGAGGCCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGGGCAACAT
 AGGGAGACCCCATCTTTACGAAGAAAAAAGGGGAAAAAGAAATCTTTTAAATCTTTGGATTTG
 ATCACTACAAGTATTATTTTACAATCAACAAAATGGTTCATCCAACTCAAACCTTGGAAAAATATCTTGC
 TTTCAAATTTGACACTA

10

20

30

40

ヒト p-カドヘリンポリヌクレオチド配列

(SEQ ID NO: 12)

```

GGCTAGCGCGGGGAGGTGGAGAAAAGAGGCTTGGGCGGCCCCCGCTGTAGCCGCGTGTGGGAGGACGCACGG
GCCTGCTTCAAAGCTTTGGGATAACAGCGCCTCCGGGGATAATGAATGCGGAGCCTCCGTTTTTCAGTC
GACTTCAGATGTGTCTCCACTTTTTTCCGCTGTAGCCGCAAGGCAAGGAAACATTTCTCTCCCGTACT
GAGGAGGCTGAGGAGTGCACTGGGTGTTCTTTCTCCTTAACCCAGAAGTGCAGAGACAGAGGCTGAGT
CCCTGTAAAGAACAAGCTCCAGAAAAGCCAGGAGAGCGCAGGAGGGCATCCGGGAGGCCAGGAGGGGTTT
GCTGGGGCTCAACCGCACCCACATCGGTCCACCTGCGAGGGGGCGGGACCTCGTGGCGCTGGACCAA
TCAGCACCCACCTGCGCTCACCTGGCCTCCTCCCGCTGGCTCCCGGGGGCTGCGGTGCTCAAAGGGGCA
AGAGCTGAGCGGAACACCGGCCCGCGTCCGCGCAGCTGCTTACCCCTCTCTCTGCAGCCATGGGGCT
CCCTCGTGGACCTCTCGCTCTCTCCTCCTTCTCCAGGTTTGCTGGCTGCAGTGCAGCGCCTCCGAGCC
GTGCCGGGCGGTCTTCAGGGAGGCTGAAGTGACCTTGGAGGCGGGAGGCGCGGAGCAGGAGCCCGGCA
GGCGCTGGGGAAGTATTCATGGGCTGCCCTGGGCAAGAGCCAGCTCTGTTTAGCACTGATAATGATGA
CTTCACTGTGCGGAATGGCGAGACAGTCCAGGAAAGAAGGTCACTGAAGGAAAGGAATCCATTGAAGAT
CTTCCCATCAAACGTATCTTACGAAGACACAAGAGAGATGGGTGGTTGCTFCCAATATCTGTCCCTGA
AAATGGCAAGGGTCCCTTCCCCAGAGACTGAATCAGTCAAGTCTAATAAGATAGAGACACCAAGAT
TTTCTACAGCATCACGGGGCCGGGGGCGAGACAGCCCCCTGAGGGTGTCTTTCGCTGTAGAGAAGGAGAC
AGGCTGGTTGTTGTTGAATAAGCCACTGGACCGGGAGGAGATTGCCAAGTATGAGCTCTTTGGCCACGC
TGTGTGAGAGAATGGTGCTCAGTGGAGGACCCCATGAACATCTCCATCATAAGTACCAGCAGGAATGA
CCACAAGCCCAAGTTTACCCAGGACACCTTCCGAGGGAGTGTCTTAGAGGGAGTCTTACCAGGTACTTC
TGTGATGCAGATGACAGCCACAGATGAGGATGATGCCATCTACACCTACAATGGGGTGGTTGCTTACTC
CATCCATAGCCAAGAACCAAAAGGACCCACACGACCTCATGTTACAATTCACCGGAGCACAGGCACCAT
CAGCGTCACTCCAGTGGCCTGGACCGGGAAAAGTCCCTGAGTACACACTGACCATCCAGGCCACAGA
CATGGATGGGGACGGCTCCACCACCAGGTCAGTGGCAGTAGTGGAGATCCTTGATGCCAATGACAATG
TCCCATGTTTGACCCCCAGAGTACGAGGCCATGTGCCTGAGAATGCAGTGGGCCATGAGGTGCAGAG
GCTGACGGTCACTGATCTGGACGCCCCCAACTCACAGCGTGGCGTGGCACCTACCTTATCATGGGCGG
TGACGACGGGGACCATTTTACCATCACCCACCCCTGAGAGCAACCAGGGCATCTGACAACCAGGAA
GGTTTGGATTTTGGAGCCAAAACCAGCACACCCTGTACGTTGAAGTGACCAACGAGGCCCTTTTGT
GCTGAAGCTCCAACCTCCACAGCCACCATAGTGGTCCACGTGGAGGATGTGAATGAGGCACCTGTGTT
TGTCCCACCCTCAAAGTCGTTGAGGTCCAGGAGGGCATCCCCACTGGGGAGCCTGTGTGTGTCTACAC
TGCAAGAAGCCCTGACAAGGAGAATCAAAGATCAGTACCAGCATCCTGAGAGACCCAGCAGGGTGGCT
AGCCATGGAACCCAGTACAGTGGGCGAGTCCAGTGTGGGACCCCTCGACCGTGGAGGATGAGCAGTTTGT
GAGGAACAACTACTATGAAGTCAATGGTCTTGGCCATGGACAATGGAAGCCCTCCACCATGCGCGGG
AACCCCTTCTGCTAACACTGATTTGATGTCAACGACCATGGCCAGTCCCTGAGCCCCGTGAGTACCCAT
CTGCAACCAAAGCCCTGTGCGCCAGGTGCTGAACATCACGGACAAGGACCTGTCTCCCCACACCTCCCC
TTTCCAGGCCAGCTCACAGATGACTCAGACATCTACTGGACGGCAGAGGTCAACGAGGAAGGTGACAC
AGTGGTCTTGTCCCTGAAGAAGTTCCTGAAGCAGGATACATATGACGTGCACCTTTCTCTGTCTGACCA
TGGCAACAAAGAGCAGCTGACGGTGTATCAGGGCCACTGTGTGCGACTGCCATGGCCATGTGCAACCTG
CCCTGGACCCTGGAAGGAGGTTTCATCCTCCCTGTGTGGGGGCTGTCTGGCTCTGCTGTTCCTCCT
GCTGTGTGCTGCTTTTGTGGTGGAGAAAGAAGCGGAAGATCAAGGAGCCCTCCTACTCCAGAAGATGA
CACCCGTGACAACCTCTTCTACTATGGCGAAGAGGGGGTGGCGAAGAGGACCAAGGACTATGACATCAC
CCAGCTCCAACGAGGTCTGGAGGCCAGGCCGGAGGTGGTTCTCCGCAATGACGTGGCACCACCCATCAT
CCCGACACCATGTACCGTCTTAGGCCAGCCAACCCAGATGAAATCGGCAACTTTATAATTTGAGAACCT
GAAGGCGGCTAACACAGACCCACAGCCCCGCCCTACGACACCCTCTTGGTGTTCGACTATGAGGGCAG
CGGCTCCGACGCGCGCTCCCTGAGCTCCCTCACCTCCTCCGCTCCGACCAAGACCAAGATTACGATTA
TCTGAACGAGTGGGGCAGCCGCTTCAAGAAGCTGGCAGACATGTACGGTGGCGGGGAGGACGACTAGGC
GGCTGCCCTGCAGGGCTGGGGACCAAACGTCAGGCCACAGAGCATCTCCAAGGGGTCTCAGTTCCCCCT
TCAGCTGAGGACTTCGGAGCTTGTGTCAGGAAGTGGCCGTAGCAACTTGGCGGAGACAGGCTATGAGTCTG
ACGTTAGAGTGGTTGCTTCTTACCTTTAGCCTTTAGGATGGAGGAATGTGGGCGAGTTGACTTACGACTGAA
AACCTCTCCACCTGGCCAGGGTTGCCCTCAGAGGCCAAGTTTCCAGAAGCCTTTACTTCCGTAATAAT
GCTCAACCTTGTGTCTGGGCTGGGCTGCTGTGACTGACCTACAGTGGACTTTCTCTCTGGAATGGA
ACCTTCTTAGGCCTCCTGGTGCAACTTAATTTTTTTTTTTAATGCTATCTTCAAAAAGTTAGAGAAAGT
TCTTCAAAAAGTGCAGCCAGAGCTGCTGGGCCACTGGCCGCTCCTGCATTTCTGGTTTCCAGACCCCAA
TGCCCTCCCATTCGGATGGATCTCTGCGTTTTTATACTGAGTGTGCTAGGTTGCCCTTATTTTTTATT
TTCCCTGTTGCGTTGCTATAGATGAAGGGTGGAGACAATCGTGTATATGTACTAGAAGCTTTTTTTATTA
AGAAACTTTTCCC

```

10
20
30
40

【0207】

(表2)3つの乳癌コホートにおける、ESR1レベルのみによって定義した群での腫瘍サブタイプの分布

それぞれの腫瘍に関して、ESR1、ERBB2およびGRE7の値をダウンロードした。本発明者らは、HER-2増幅性腫瘍を、ERBB2およびGRB7の両者ともに高い発現レベルを有するものと定義した。本発明者らはESR1発現レベルをHER-2腫瘍またはBRCA1腫瘍の定義には用いていないため、これらの表にはそれらを含めていない。残りの腫瘍をESR1のレベルに基づいて4つの群に分け、その際、閾値は各データセットに対して決定し、研究の著者らによって定義されたサブタイプのそれぞれにおけるサンプル数を算定した。各研究とも、「基底状

50

」または「基底状1」のいずれかとして特定された腫瘍の100%が、最も低いESR1の範囲に該当した。Sorlieにより分類されたデータでは、管腔A腫瘍の90%超が上位2つのESR1群にあることが見いだされた。最大の群である「不明」または「分類不能」腫瘍は、常にESR1発現の中間範囲に該当した。

【0208】

van't VeerのデータにおけるERBB2増幅^bを伴わない84件の散発性腫瘍のセットに関するSorlieの分類

群 ^a	管腔A N=25	管腔B N=12	基底状 N=20	正常 N=4	不明 N=23	合計 N=84
ESR1 \geq 2	17	1	0	1	2	21
0.2 \leq ESR1 \leq 0	6	3	0	1	8	18
0 \leq ESR1 \leq 0.5	2	6	0	1	10	19
ESR1<0.5	0	2	20	1	3	26

10

ERBB2増幅を伴わない97件の散発例および6件の非癌^cのセットに関するSorlieの分類

群 ^a	管腔A N=27	管腔B N=9	基底状 N=19	正常 N=10	不明 N=37	ERBB2 ^e N=1	合計 N=103
ESR1 \geq 9	10	0	0	0	6	0	16
1.9 \leq ESR1 \leq	15	0	0	0	8	0	23
1 \leq ESR1 \leq 1.5	2	7	0	8	13	0	30
ESR1<1.5	0	2	15	2	9	1	29
不明	0	0	4	0	1	0	5

20

ERBB2増幅^dを伴わない85件の散発性腫瘍に関するSortirouの分類

群 ^a	管腔1 N=18	管腔2 N=20	管腔3 N=22	基底状1 N=14	基底状2 N=7	ERBB2 ^e N=4	合計 N=85
ESR1 \geq 7	6	5	2	0	0	0	13
2.7 \leq ESR1 \leq 2.25	8	9	13	0	1	0	31
1.25 \leq ESR1 \leq 0.3	4	6	5	0	1	1	17
ESR1<0.3	0	0	2	14	5	3	24

^a これらの表におけるグループ分けは、チャートの左上にある第1群(黒く陰をつけたもの)がESR1強陽性、その下の第2群が中程度、第3群を弱陽性、第4群をESR1陰性となるようにしている。さらに、「不明」または分類不能の腫瘍の群は、そのように列記している。

30

^b van't Veerのデータ：78件の訓練用試料 + 19件の被験試料 - 14件がERBB2増幅性、比の値は \log_{10} である。

^c Sorlieのデータ：115件の腫瘍 + 7件の非悪性組織 - 18件がERBB2増幅性、比の値は比の値は \log_2 である。

^d Sortirouのデータ：99件の腫瘍 - 14件がERBB2増幅性、比の値は比の値は \log_2 である。

^e 研究の著者らによればERBB2と分類されるが、本発明者らの基準によればERBB2に関して増幅性ではないと分類される腫瘍の分布。

【0209】

(表3) van't Veerの研究における、サブタイプ別にみた97件の散発性腫瘍の予後

40

このコホートにおける散発性腫瘍の97例の患者は、5cm未満の浸潤性乳房腫瘍を有し(T1またはT2)、腋窩転移はなく(N0)、55歳になる前に診断された。5例の患者はアジュバント全身療法を受けた。試験における追跡期間は少なくとも5年であった。これらの97件の試料には、訓練セットに用いた78件の試料、および予後の分類に用いた19件の腫瘍が含まれる。ESR1陰性およびERBB2陽性のサブグループは予後が最も不良とされた(それぞれ69%および60%)。ESR1弱陽性サブタイプは予後が最も良く(68%)、ESR1レベルが高いほど予後不良となる傾向がみられる。

群	腫瘍群 ^c	予後良好 ^a		予後不良 ^b		合計
		サンプル数	% (群)	サンプル数	% (群)	
	ESR1 強陽性	12	57%	9	42%	21
	ESR1 中等度陽性	12	63%	7	36%	19
	ESR1 弱陽性	13	68%	6	31%	19
	ESR1 陰性	7	30%	16	69%	23
	ERBB2+	6	40%	9	60%	15
	合計 (予後)	50		47		97

^a 予後良好は > 5年において遠隔転移がないと定義される。

^b 予後不良は < 5年において遠隔転移と定義される。

^c 腫瘍群は上記の通りに定義される。

【図面の簡単な説明】

【0210】

【図1】図1AはROR1の完全なヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 1) を示しており、図1Bは完全なアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を示している。例えば、Masiakowski et al., J. Biol. Chem. 267 (36), 26181-26190 (1992); NP_005003 (gi:4826868); および M97675 (gi:337464) を参照されたい。

【図2】図2Aは、類似の乳癌サブタイプ (例えば、一群の共通した特徴を有する) が、Rosetta/Netherlands データセット (Van't Veer, L. J., et al. (2002) Nature 415, 530-536) および Stanford/Norway データセット (Sorlie et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Sep 11; 98(19):10869-74) の両方で、いかにして識別されるかを示している。Rosetta/Netherlands データセットは、ESR1 および ERBB2 の発現レベルならびに BRCA 変異の識別に基づく、強制的なクラスの定義である。Stanford/Norway データセットは、クラスターに基づくクラスの定義である。マーカーは、著者らによってクラスターの例として選択されたもののサブセットである。これらのデータセットにおける発現レベルは、試料と参照との log₁₀ 強度比として測定される。図2Bは、原発性乳癌に認められる広範囲にわたる特性を表すために選択された種々の細胞系のプロファイル (例えば、遺伝子発現パターン、細胞学的特徴など) の比較を示すために、(図2Aにおけるものとは異なる) 参照RNAを用いている。

【図3】図3Aは、Van't Veer, L. J., et al. (2002) Nature 415, 530-536 で同定された基底状サブタイプおよび BRCA1 サブタイプ (第4群および第6群) の乳癌腫瘍において、ROR1 mRNA 発現が特異的にアップレギュレートされることを示している。図3Bは、Van't Veer et al., 前記で同定された乳癌サブタイプにおける ESR1、HER2 および BRCA1/2 mRNA の発現を示している。図3Cは、種々の細胞系における ROR1 mRNA ならびに他のさまざまなマーカーの発現を示した概略図を提示している。

【図4】図4Aは、予後による ESR1 および ROR1 の散布図を示しており、ROR1 を発現する腫瘍が、Van't Veer, L. J., et al. (2002) Nature 415, 530-536 で同定された乳癌サブタイプにおける予後不良 (5年未満で転移) と関連付けられることを示している。17件の過剰発現性 ROR1 試料のうち、予後が良好なのは3件のみである。試料のうち7件は BRCA1 変異を有するが予後データはないものの、BRCA1 変異は一般的に転帰不良と関連付けられる。残り10件の試料のうち7件は予後不良である。単一の遺伝子に関するこの予後不良のパーセンテージは、これまでに検討された13種の遺伝子のうち悪い方である。ROR1 群における予後不良腫瘍のパーセンテージ (散発例の70%) は、HER-2、EGFR、VEGF、FLT3、MYC、UPA および PAI を含む、分析された他のいずれの単一の予後判定遺伝子よりも高い。図4Bは、予後による HER2 の散布図であり、HER-2 を過剰発現する腫瘍の54%が予後不良な試料であることを示している。13件の HER2 過剰発現性腫瘍のうち6件は予後良好と関連付けられる。BRCA1 試料はいずれも HER2 を過剰発現しない。すべての試料がリンパ節転移陰性の早期疾患と関連付けられるものの、HER2 試料の50%超が予後不良である。

【図5】図5Aは、さまざまな乳癌細胞株における ROR1 mRNA 発現のノーザンブロット分析を示している。5種の乳癌細胞株は、正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC) と比較して ROR1 を有意

10

20

30

40

50

に過剰発現する。ROR1は不死化HMECおよびBT20でも検出可能である。この発現パターンは、管腔細胞系はいずれも検出可能なROR1を発現しない点で特に興味深い。過剰発現性の細胞系は、高度のROR1発現を示す基底腫瘍群と類似した基底のまたは間葉性/間質性のいずれかとして特徴付けられている。このデータは腫瘍細胞におけるROR1の発現を裏付けている。図5Bは、種々の癌細胞における、ノーザン法によるROR1 mRNA発現(ホスホイメージャー単位)の棒グラフを示している。図5Cは、種々の癌細胞における、対数比(ROR1/複合参照)として表したノーザン法によるROR1 mRNA発現の棒グラフを示している。図5Dは、種々の癌細胞における、対数比(ROR1/複合参照)として表したマイクロアレイによるROR1 mRNA発現の棒グラフを示している。図5Eは、ノーザン法によるROR1 mRNA発現とマイクロアレイによるROR1 mRNA発現との比較グラフを示している。図5Fおよび図5Gは、SKBR細胞を比較用細胞系として用いて、ウサギポリクローナル血清を用いたCAL51細胞における内因性ROR1タンパク質の検出を示している(左の図はこの抗ROR1抗体に曝露された細胞を示している)。

【図6】図6Aは、UCLAで得られた原発性腫瘍におけるROR1および関連遺伝子の発現データの概略図を示している。手短かに述べると、42件の原発性乳癌からのコア生検試料を急速凍結してアッセイした。これらの生検試料に関する選択基準は腫瘍が>2cmとした。発現プロファイルにはCy5 Cy3参照cRNAで標識した腫瘍cRNAを用いる60-mer Agilentオリゴヌクレオチドアレイを利用した。図6Bは、基底状、HER-2過剰発現性および管腔状の癌サブタイプにおけるROR1発現データのチャートを提示しており、これはROR1が基底状サブタイプの最良のマーカーであることを示している。図6Cは、種々の細胞におけるROR1発現のグラフを提示しており、これはROR1が専らエストロゲン受容体(ER)陰性乳癌に限定して発現されることを示している。図6Dは、種々の細胞におけるROR1発現のグラフを提示しており、これはROR1が専ら基底の(アンドロゲン受容体陰性)乳癌に限定して発現されることを示している。

【図1A】

```

GAGCTGGAGCAGCGCCACCGCCCGCCGAGGGAGCCCGGGACGCGAGCCCTGGCGCAGGGTGCCT
GTTCCTCGGAGTCCGACCCAGGGCGACTCACGCCACTGGTGGACCCGGGACAGCTTGGGACTGACCCCGC
GCCAGCGAGGCTGCAAGCCAGGGCTGGGAAGGGATCGCTCGCGCATCCAGAGGCGCCAGCGGCGGA
GGGAGGGAGCAGGTTAGAGGGACAAGAGGTTTCAGACGCTCCCGCGCTCTCGGAGCGCCAGCGCGCG
GGACAGGGCGGGCGGGAGCCCGGGAAGAGCCCTGGGATGTTCTGGCGCGCGCTGGGAGCCCGCCCGCC
CCGCTCAGCAGAGGAGGAACTCACCGCCCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCTGGGCTGCTGCT
GCCGCGCTGGCTGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG
GCTCCTCATCAGTGAACAATCCAGAACTCCAGAACTCCAGAACTCCAGAACTCCAGAACTCCAGAACT
ATACCACTCACACGCTCTGGCCAGACAGCAAACTGCCTCAAAAGTCTCTGGGATCCACCTCCACCA
ATCCCGTGGTCAAAAATGATGCTCTCTGGTCCAGAGAGCCCGGAGGCTCTCCCTTCCGCGCCACCACTA
TGCTCTCCGCTCGCGGATAGAACTCCAGACCCAGACACAGCTACTCCAGCTGGCGTGGCAACAAGC
CGAAGAGGGTGGTCTCTTCACTGGAGTCTTGTGTCAAGTCTGGCCCCCTCCACTCGAAGTCCAGGA
TACTCA GATGAGTATGAGAAGATGAGATCTTGTAGCATGCAAGGGGAAATGAAAATCAGATCAGACTG
CAACCGCACCGTCTATATGAGTCTTTGACATGCAAGGGGAAATGAAAATCAGATCAGACTGCAATTC
CTATGATTTGCACTTCCAGTCACTTATCTGATGAGTGTCTCAGTTCGCCATTCCTTCCCTGGCCACTA
GCCTCCCGTACTGCGATGAACTTCACTCCGACCAAGCCCGTGTGACTGTGTGCGGATGAAATGAAAT
CCTGGAGAATGCTCTGTCAACAGAGTACATTTTGGCAAGTCAAAATCCATGATCTGATGAGGCTGA
AACTGC AAAATGTAAGATCTCCCGCAGCAGAGAGCCAGAACTGCGAATGATCCGATGGAAT
CCCATGCGAGTCTATAAAATAAAATCAAAAGTGTATTAACAGCAGAGGTTGCACTCCGGGGAGCCGT
CAGTGTACCCAAATCAGGGCGCCAGTCCAGCCATGGAATTCAGATTCACCA CACACACTTTCACCG
CCCTTCGTTCCAGAGCTGAAATGAGGCGCATCTCTACTCGCGCAACCCAGGGAATCAAAAGGAAGCTCC
TGGTCTTACCTTGGATGAAAATCTTAAAGTCTGATCTGTGCACTCCAGCTTGCATGCAAAAGGATTC
CAAGGAGAAGAAATAAAATGGAATCTTATCACTACTAGTCCAAAGTGTGGCCATTCCTCCCTGGCCAT
TACTCTTCTCTTCTTATTGGGTCTGGGAAATAACAGAAATCATGTCGGCAC CAGTCCAGAGGCAACCA
AAACACTGTCAGAGTCAAAATGTTGAGATGTCATGCTGAATGCATATAAACCC AAGAGCAGAGCTAAAGA
GCTACCTCTTCTGCTGTACGCTTTATGGAAGAAATGGGTGAGTGTCCCTTGGAAAATCTATAAAGGCC
ATCTCTATCTCCAGGCTGAGCACTGCTCAGCTGGTGTGCTATCAGAGCTTGA AAGACTATAACACCC
CAGCAATGGATGAAATTCACACAGAACTCTCTTAAGGCAAACTGCACCCAC CCAATAATGCTCTGCT
CTAGGTGGCGTCACTCAGGAACACTGTGTGATCTTTTGAATATTTAATCAGGGGATCTCAGT
AGTCTCCATGATGAGATCCCACTCTGATGTGGCTGGCAGCAGTATGAGAATGGGACTGTGAAATCC
AGCCGAGCAAGCAGAGATTTCTGCACATGCAATTCAGATTCAGCTGGCATSGAATACCTGTCTAGTCA
CTCTTCTGTCACAGAGCTTGCAGCTCGCAATTTTAAATCCGAGAGCACTTCAATGAAAGATTTAG
ACTGGGGCTTTCCAGAGAAATTTACTCCGCTGATTACTACAGGGTCCAGAGTAACTGCTTGGCCCAT
CGTGGATGCCCCCTGAAGCCTATGATGGCAAAATCTCTCTGATGAGATATCTGCTCTTGGGGT
TGTCTTGTGGAGATTTTCAAGTTTGGACTCAGCCATATATGATGATCAGTAA CAGAGAGTGAATGAGA
TGGTGAAGAAACGCGAGCTTACCACTGCTGAAAGACTGCCACCCAGAGATGA CAGCTCATGACAGAG
TGCTGAAATGAAATCTTCTAGGAGACCAAGATTTAAAGATATTCAGTCCGCGCTTCGCTCTGGAGGG
ACTCTCAAGTACACAAAGCTTACTACTCTTCCAGGGGAAATGCCCACCA CAGACAACTTCCCTCAGTG
CCAGCCAGTGAATATCTCAGTAAACCCAGATATCTTAATACATGTTCCCGA GCCAGGGATATACACCA
CAGGCGCAGATGTGGTTCATTTGGCCCGCAATACCTCAGAACAGAGATTCAT TCCCATCAATGGAATA
CCCAATACCTCGATGATGAGGCTTCCAGCTGCCCCATCCAGGCCAACAGS TCCCTCCAGAGTATC
AGCACTGCCACCTCCCAAGAGTGGTCCCAAGCAGTCCAGTGGTGCATGCACTGGCCATGTGACT
AGCTTCCCTCATCAGATCCAAATCAGGAAGCAAAATTTCTTTACTACCACAC ATGTCAATTCAAAATCA
TCTCTGTTGAGATGGTATACCCGTTTGGGCAACAATCTCAAAAACCTTACAAA AATTTGACTCAAGAGCA
CTCTTACTAGGAGACCCCAATATTCATGAGACACAGCACTGATGATTTCTG9 CAGAACTGTAAATGCA
CAACTTTGTAATGTTGATACAGCAACACTGACGCGCGTGAAGAAATTAATAATCAATGTTTTTA
TTAAAGTAAAGGTTCTCATTAGCGCAATGCGACAAAGTACTCTCTGAAAGTTTCACTGTGCTTACCAA
CGAGGACAGACACTCGGCCG (SEQ ID NO: 1)

```

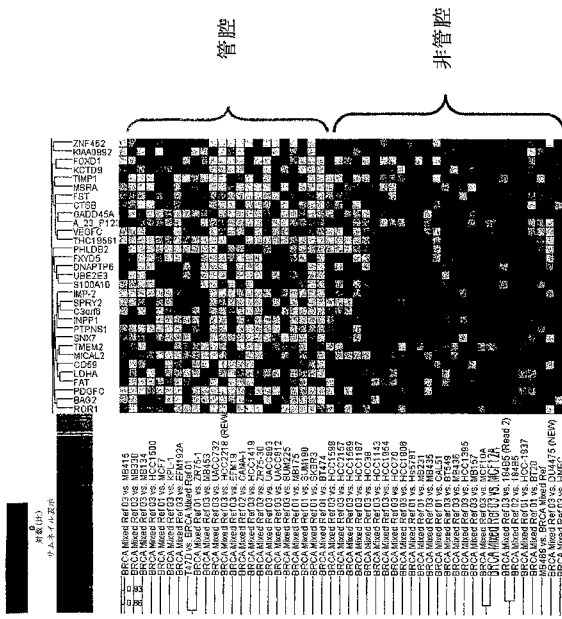
【図1B】

```

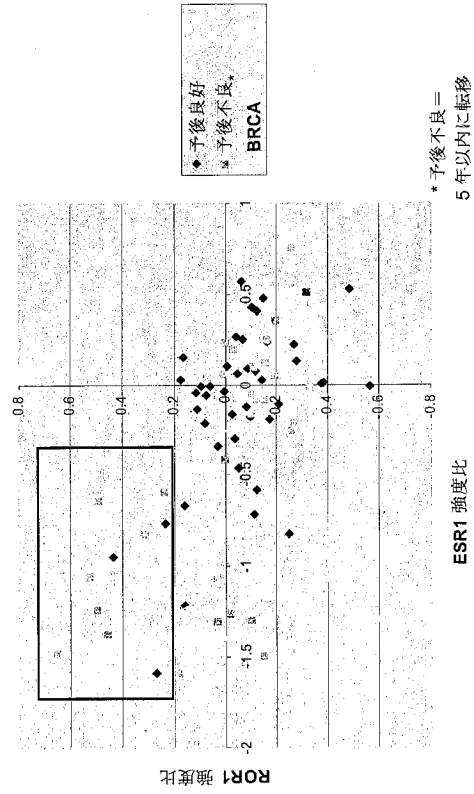
MHRPRRRTGTPPLALLALLLAARGAAQSTELSVSLVPTSSWVSSSELNKSYSYLLDDBPMNNITSL
GQTLREHCKVSNBPTTWFKNDAFVQBPRLSFRSTTGSRLRIRNLDTDTGTFQVCAITNGKEVSS
TGVLFVKGPPPTASPGVSDYBEPGFCOPTRGACARPTGNVTYVWESLMOGTENOTIAFTMGTSS
HLSDKCSQFAPSLCHYAFPPYCDETSQVSKPRLCRDCECELENVLCQTFYIIPARSNPMILMLKLPWED
LQPEPSBAANCRTIIGIPMADPINKNHCYNSTGVYVYRSTVSYTKSGRQCPWNSQYPHHTFALFFPEL
NGSHYCRNPNQKRAPFCPTLDENFKSLDCDIPACDSKDSKKNMVEILYLVPVVAIPLAIALFFFC
VCRNQKSSAPVQPKHVRQNVEMSLNLAIFKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAPKIYKGLHFLPM
DHAGLVAIKLKDYNPQWMEFQGBASIMAEHLHPHIVCLLGAVTGPOVPCMLFEYINQDLEHFLMRS
PHSDVGCSDDEDTVKSGLDHLFHLIAIQAAGMEYLSHFFVHKHLLAARNLIGELHVKISDLGLSRE
IYSADYRVQKSLPIRWPPEALIMYKFSDDSIWSFGVLWBSIYSPGLQPYGFSNQEVIEMVRKRL
LFCSEDCPRMYSLMECEWNEIPSRFRPKDIHVRLESLWELSSHTSSTPGGNATQTTSLSAFPVNL
SNRSPNMFPSQGITPQQIAGPIQPIFQNRFPINQYPLPQYAAFAAHYQPTGPPRVIQHCPPPK
SRSPSSASGSTTHVTSLPSGSGNQEANIPLPHMSIPNHPCMGITVFGNKSQPKYKIDSQKASLLGDA
NIHGHTESMISAE (SEQ ID NO: 2)

```

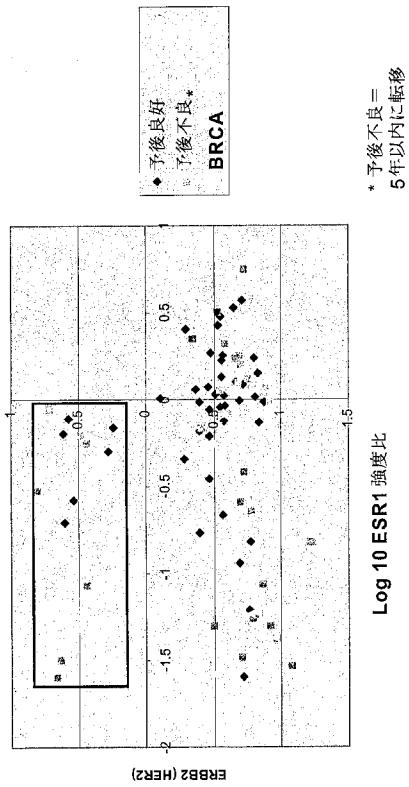

【 図 3 C 】



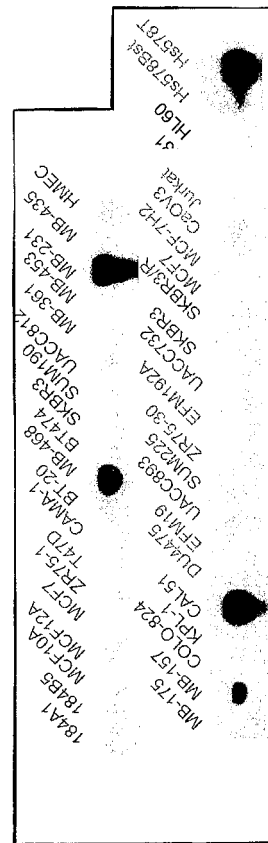
【 図 4 A 】



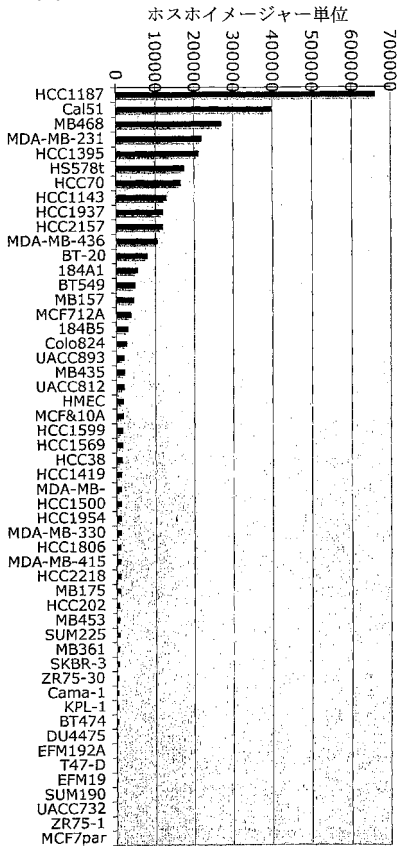
【 図 4 B 】



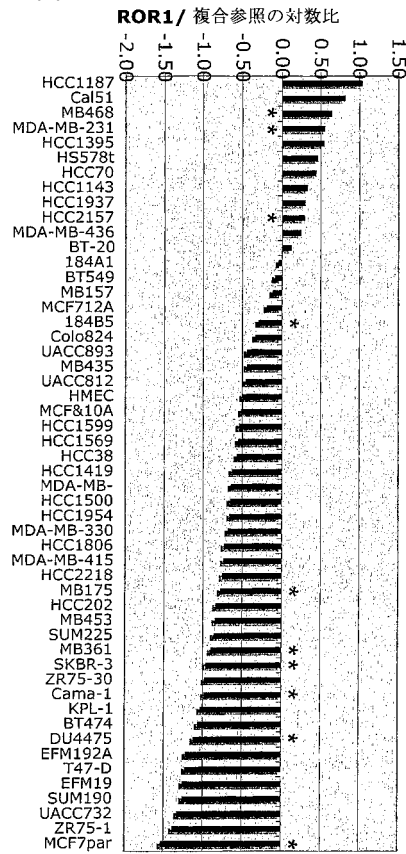
【 図 5 A 】



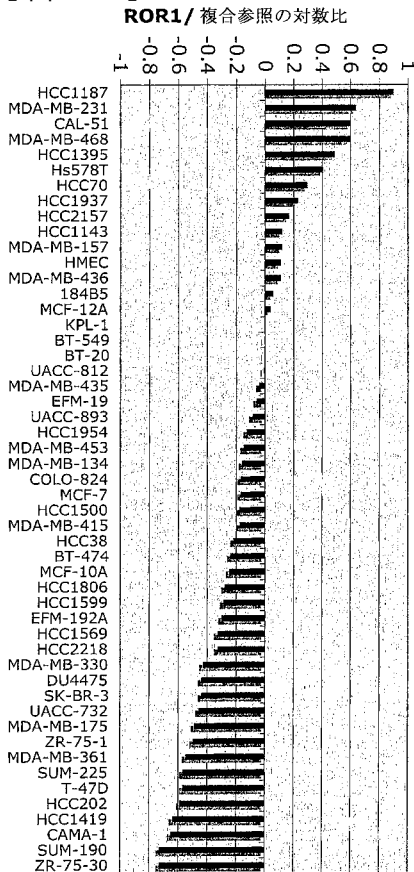
【図 5 B】



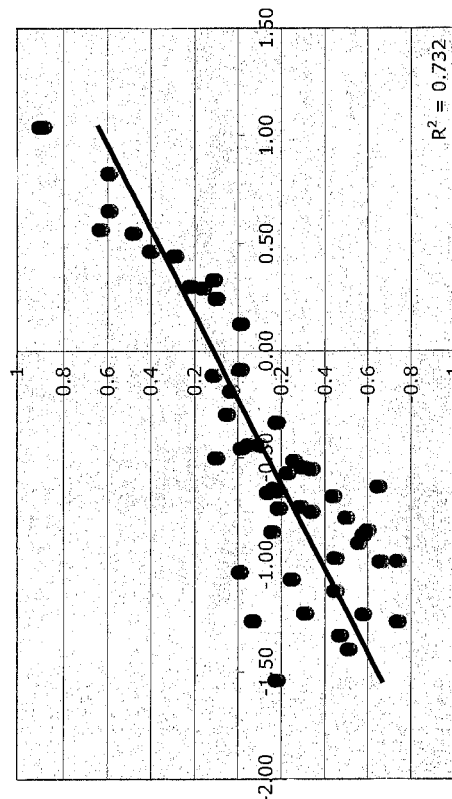
【図 5 C】



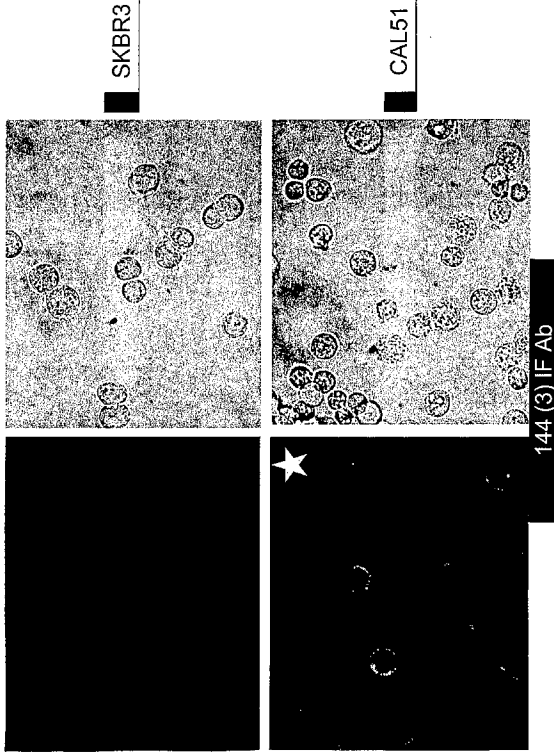
【図 5 D】



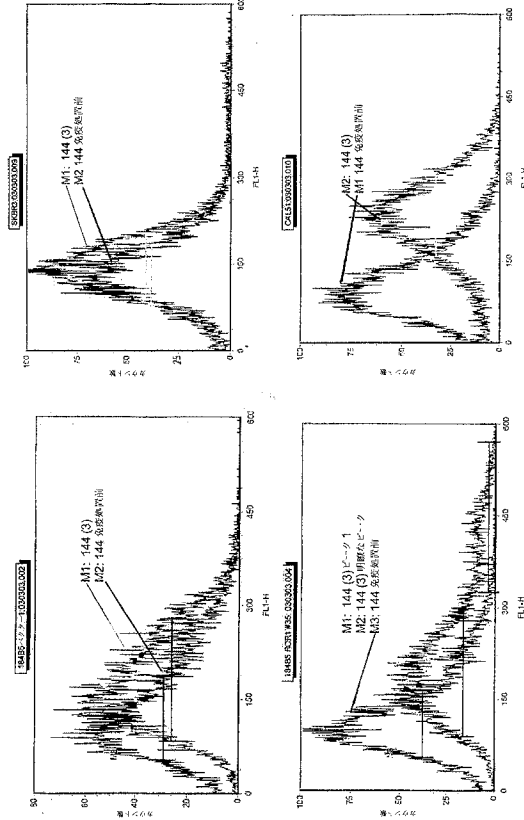
【図 5 E】



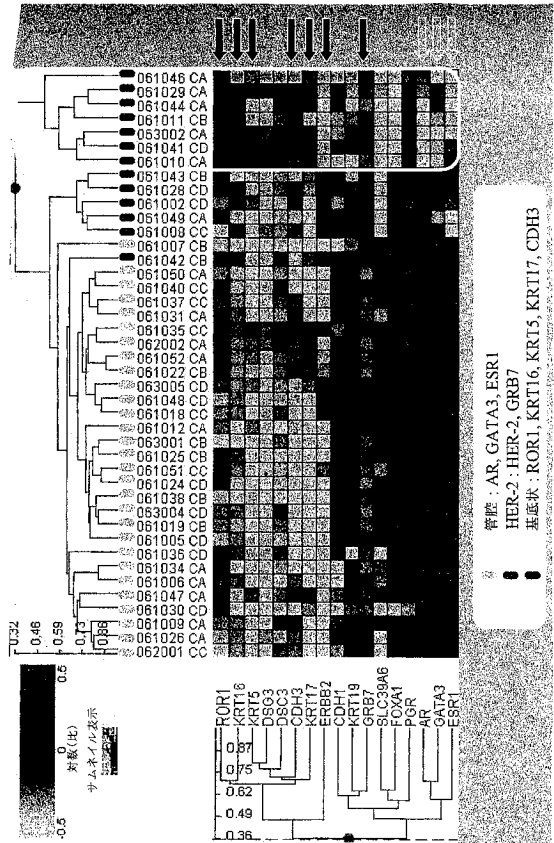
【 図 5 F 】



【 図 5 G 】



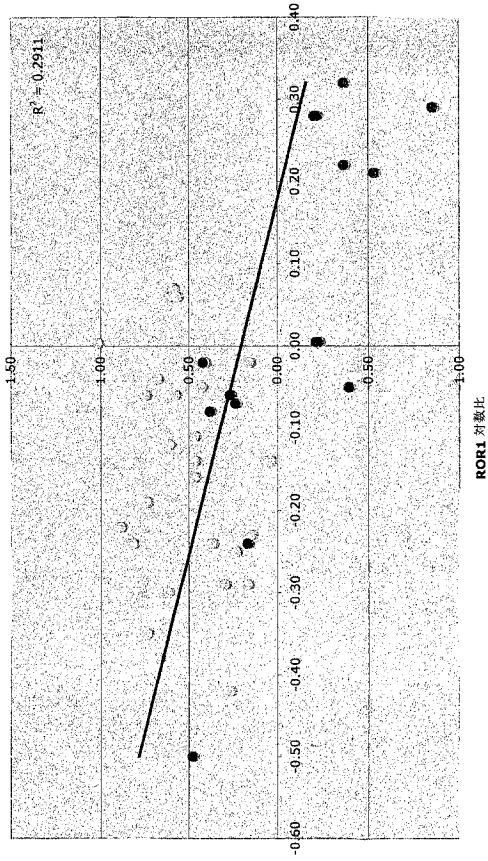
【 図 6 A 】



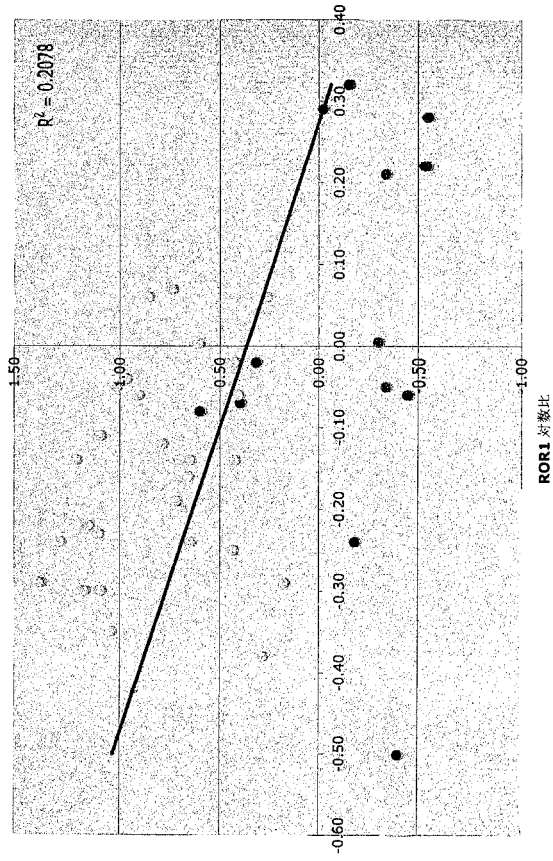
【 図 6 B 】



【 図 6 C 】



【 図 6 D 】



【 配列表 】

[2007532111000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/11425
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G06F 19/00; G01N 33/48, 33/50 US CL : 436/6; 703/20 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/6; 703/20 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, WPLX, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
AT	US 2005/0079508 A1 (DERING et al) 24 April 2005 (24.04.2005), see entire document.	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"I"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 18 June 2005 (18.06.2005)		Date of mailing of the international search report 20 JUL 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Alana M. Harris, Ph.D. Telephone No. 571-272-1600

 フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 スレイモン デニス ジェー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウッドランド ヒルズ カルバート ストリート 2312
 2

(72) 発明者 ウィルソン シンディー エー .
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロサンゼルス チャールズ イー . ヤング 通り 南 6
 75

(72) 発明者 デリング ジュディ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウェストレイク ヴィレッジ リム クレスト サークル
 841

Fターム(参考) 4B024 AA12 CA09 CA12 HA08 HA12
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ53 QR08 QR42 QR55 QR62 QS25 QS34
 QS36 QX02

专利名称(译)	孤儿受体酪氨酸激酶作为乳腺癌的靶点		
公开(公告)号	JP2007532111A	公开(公告)日	2007-11-15
申请号	JP2007507418	申请日	2005-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	该Rejentsu大学加州		
[标]发明人	スレイモンデニスジェー ウィルソンシンディーエー デリングジュディ		
发明人	スレイモン デニス ジェー. ウィルソン シンディー エー. デリング ジュディ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/68 G06F19/00		
CPC分类号	G01N33/57415 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/154 G01N33/6872		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A G01N33/53.M G01N33/574.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/559762 2004-04-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
描述了孤儿受体酪氨酸激酶 (ROR1) 的方法和材料。 ROR1显示正常成人组织中有限的组织表达，并且在某些乳腺癌亚型中过表达。 ROR 1提供乳腺癌的诊断和/或治疗靶标。

腫瘍細胞に染色が全く観察されない。	0
腫瘍細胞にわずかな/辛うじて認知し得る染色が検出される。	1+
腫瘍細胞に弱いし中等度の完全な染色が観察される。	2+
腫瘍細胞に中等度ないし強い完全な染色が観察される。	3+
腫瘍細胞に強いし非常に強い完全な染色が観察される。	4+