

(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2013-518579

(P2013-518579A)

(43) 公表日 平成25年5月23日(2013.5.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 ZNAA	2G045
G01N 33/50 (2006.01)	G01N 33/50 P	4B024
G01N 33/68 (2006.01)	G01N 33/68	4B063
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/53 M	4C084
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 110 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2012-551704 (P2012-551704)	(71) 出願人	505246789 学校法人自治医科大学 栃木県下野市薬師寺3311-1
(86) (22) 出願日	平成23年2月4日 (2011.2.4)	(74) 代理人	100073184 弁理士 柳田 征史
(85) 翻訳文提出日	平成24年9月28日 (2012.9.28)	(74) 代理人	100090468 弁理士 佐久間 剛
(86) 国際出願番号	PCT/IB2011/000382	(72) 発明者	間野 博行 113-0033 東京都文京区本郷4丁目13番3号
(87) 国際公開番号	W02011/095894	(72) 発明者	チョイ, ヨン エル 111-0056 東京都台東区小島2丁目3番4号204号室
(87) 国際公開日	平成23年8月11日 (2011.8.11)		
(31) 優先権主張番号	61/337,465		
(32) 優先日	平成22年2月4日 (2010.2.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ALK阻害剤に対する自然耐性または獲得耐性を有する癌の同定、評価および治療法

(57) 【要約】

ALK突然変異陽性の癌を有する被験体がALK阻害剤を用いた治療に反応を示す可能性が高いか否か、および/または、このような癌を有する患者の疾患の進行が比較的遅くなる可能性が高いか否かを判定するための組成物、キット、および方法について説明する。さらには、このような癌を有する被験体における疾患の経時変化を予測する方法についても説明する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

A L K 阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加した、癌を有する被験体または癌を発現するリスクを有する被験体を同定する方法であって、

a . 前記患者からサンプルを採取し、

b . 前記サンプルを分析して 1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子の存在を検出する、

ことを含み、

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子の存在が、前記被験体の前記 A L K 阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加したことを示唆することを特徴とする、方法。

10

【請求項 2】

A L K 阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加した、癌を有する被験体または癌を発現するリスクを有する被験体を同定する方法であって、

a . 前記患者からサンプルを採取し、

b . 前記サンプルを分析して、1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの発現量、構造、および / または活性を検出する

ことを含み、

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの存在が、前記被験体の前記 A L K 阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加したことを示唆することを特徴とする、方法。

20

【請求項 3】

前記被験体が、A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けていないか、または A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けていて、前記 A L K 阻害剤に対して少なくとも部分耐性を発現していることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

前記癌が、未分化大細胞リンパ腫、神経芽細胞腫、乳癌、結腸直腸癌、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、および非小細胞肺癌からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 5】

前記 A L K 阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、P D D、2 - メチル - 1 1 - (2 - メチルプロピル) - 4 - オキソ - 4 , 5 , 6 , 1 1 , 1 2 , 1 3 - ヘキサヒドロ - 2 H - インドゾロ [5 , 4 - a] ピロロ [3 , 4 - c] カルバゾール - 8 - イル [4 - (ジメチルアミノ) ベンジル] カルバメート、(1 S , 2 S , 3 R , 4 R) - 3 - ({ 5 - クロロ - 2 - [(1 - エチル 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 6 - メトキシ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 7 - イル) アミノ] - 4 - ピリミジニル } アミノ) ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - カルボキサミド、および N V P - T A E 6 8 4 からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 ~ 3 いずれか 1 項記載の方法。

30

【請求項 6】

前記サンプルが、痰、気管支肺胞洗浄、胸水、組織、全血、血清、血漿、頬腔擦取物、唾液、脳脊髄液、尿、排泄物、循環腫瘍細胞、循環核酸、および骨髄からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

40

【請求項 7】

前記サンプルが組織であり、前記組織が腫瘍または癌の組織であることを特徴とする請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

前記サンプルが細胞を含むことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 9】

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドが、表 1 記載の、突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドからなる群より選択される

50

ことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 10】

前記 1 つ以上の A L K 突然変異が核酸ハイブリダイゼーション分析によって評価されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

前記 1 つ以上の A L K 突然変異がポリメラーゼ連鎖反応によって評価されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】

前記 1 つ以上の A L K ポリペプチドの発現量が、前記 1 つ以上の A L K ポリペプチドに特異的に結合する試薬を使用して検出されることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

10

【請求項 13】

前記試薬が、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメントからなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 2 記載の方法。

【請求項 14】

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの量、構造および / または活性が対照サンプルと比較されることを特徴とする請求項 2 記載の方法。

【請求項 15】

前記 1 つ以上の A L K 突然変異が、第 1 の時点およびその後の少なくとも 1 つの時点において評価されることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 16】

前記サンプルが、生殖細胞系または体細胞ゲノム DNA を含むことを特徴とする請求項 1 または 2 記載の方法。

20

【請求項 17】

癌を有する、または癌を発現するリスクのある患者を治療する方法であって、

a . 前記患者からサンプルを採取し、
b . 前記サンプルを分析して、表 1 記載の 1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子の存在を検出し、

c . A L K 阻害剤を治療に有効な量で前記患者に投与する、

ことを含む、方法。

【請求項 18】

前記 A L K 阻害剤が、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、P D D、2 - メチル - 1 1 - (2 - メチルプロピル) - 4 - オキソ - 4 , 5 , 6 , 1 1 , 1 2 , 1 3 - ヘキサヒドロ - 2 H - インドゾロ [5 , 4 - a] ピロロ [3 , 4 - c] カルバゾール - 8 - イル [4 - (ジメチルアミノ) ベンジル] カルバメート、(1 S , 2 S , 3 R , 4 R) - 3 - ({ 5 - クロロ - 2 - [(1 - エチル 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 6 - メトキシ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 7 - イル) アミノ] - 4 - ピリミジニル } アミノ) ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - カルボキサミド、および N V P - T A E 6 8 4 からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

30

【請求項 19】

前記 A L K 阻害剤が P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 であることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

40

【請求項 20】

前記被験体が、A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けていないか、または A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けていて、前記 A L K 阻害剤に対して少なくとも部分耐性を発現していることを特徴とする請求項 1 7 記載の方法。

【請求項 21】

A L K 阻害剤を用いた治療に対する癌患者の化学的感受性を判定するキットであって、1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドに特異的に結合する試薬 ; および

使用説明書

50

を含む、キット。

【請求項 2 2】

A L K 阻害剤をさらに含むことを特徴とする請求項 2 1 記載のキット。

【請求項 2 3】

前記試薬が、1 つ以上のポリヌクレオチドプローブを含み、

前記プローブのそれぞれが、表 1 に記載されるヌクレオチド配列に相補的、または表 1 に記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列を含むことを特徴とする請求項 2 1 記載のキット。

【請求項 2 4】

前記プローブが、約 $50 \sim 10^7$ のヌクレオチド長を有するポリヌクレオチドを含むことを特徴とする請求項 2 3 記載のキット。 10

【請求項 2 5】

前記プローブが、オリゴヌクレオチド、cDNA 分子、RNA 分子、および核酸塩基を含む合成遺伝子プローブからなる群より選択されることを特徴とする請求項 2 3 記載のキット。

【請求項 2 6】

前記試薬が、表 1 に記載される 1 つ以上のポリヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドに対する、抗体、および抗体誘導体、および抗体フラグメントを含むことを特徴とする請求項 2 1 記載のキット。

【請求項 2 7】

試験化合物が 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する方法であって、 20

(a) 前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドをコードする構成体をトランスフェクトされた哺乳動物細胞を前記試験化合物と接触させ、

(b) 前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの活性について前記哺乳動物細胞を評価する

ことを含み、

対照実験と比較して、前記試験化合物の存在下で顕著に調節された活性が、前記試験化合物を前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドとして同定することを特徴とする、方法。 30

【請求項 2 8】

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドが、表 1 記載の、突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドからなる群より選択されることを特徴とする請求項 2 7 記載の方法。

【請求項 2 9】

前記対照が、表 1 記載のポリペプチドからなる群より選択される野生型 A L K ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を含むことを特徴とする請求項 2 7 または 2 8 記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの活性が、A T P 結合、チロシンキナーゼ活性、癌細胞増殖、腫瘍成長、腫瘍数、アポトーシス、および腫瘍転移からなる群より選択されることを特徴とする請求項 2 9 記載の方法。 40

【請求項 3 1】

前記対照実験が、前記試験化合物の不存在下で、前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を含むことを特徴とする請求項 2 7 または 2 8 記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 1 つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの活性が、A T P 結合、チロシンキナーゼ活性、癌細胞増殖、腫瘍成長、腫瘍数、アポトーシス、および腫瘍転移からなる群より選択されることを特徴とする請求項 3 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本願は、2010年2月4日出願の米国仮特許出願第61/337,465号の優先権の利益を主張する。

【技術分野】

【0002】

本発明は、未分化リンパ腫キナーゼ (ALK) 変異の同定、さらには、ALK阻害剤に対し耐性を与える新しいALK変異の同定に基づいた、癌の同定、評価および治療法に関する。

【背景技術】

【0003】

チロシンキナーゼは、アデノシン三リン酸の末端リン酸の転移による、タンパク質基質のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素の一種である。多くの場面において、チロシンキナーゼは、細胞増殖、発癌、および細胞分化を含む多くの細胞機能のシグナル伝達における重要な役割を担う。

【0004】

EML4-ALKは、非小細胞肺癌 (NSCLC) の事例の5%以下に存在する融合型チロシンキナーゼであり、ヒトの2番染色体の短腕内に微小な逆位が生じた結果として発現する (非特許文献1、2)。EML4-ALKは、各モノマーのEML4領域内のコイルドコイル領域の相互作用の結果として構造的な二量化を被り、それによって顕著な発癌活性を得る。特に肺上皮細胞においてEML4-ALKを発現するトランスジェニックマウスは、生後速やかに両肺に数百個もの肺腺癌結節を発現するが、同マウスにALKチロシンキナーゼ活性の特異的阻害剤を経口投与すると、このような結節を肺から速やかに消失させる (非特許文献3)。これらの観察は、この融合キナーゼを抱えるNSCLCの発癌におけるEML4-ALKの重要な役割を明らかにし、さらには、この癌のためのALK阻害剤を用いた分子標的治療の実現可能性を支持する。例えば、ALKおよびMETの両方のチロシンキナーゼ活性の阻害剤であるPF-02341066の臨床試験がEML4-ALK陽性NSCLCの治療の下で行われており、その中間結果は有望である (非特許文献4)。しかしながら、EML4-ALK陽性腫瘍のサブセットは阻害剤には応答せず、したがって、未知の分子を基盤とした治療は不成功に終わる。

【0005】

PF-02341066に加えて、他のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) も、癌患者に顕著な治療活性を有することが示されている。ABL1およびKIT用のTKIであるメシル酸イマチニブは、例えば、BCR-ABL1融合キナーゼ陽性の慢性骨髄性白血病または活性化KIT陽性の消化管間質性腫瘍を有する個人の転帰を顕著に改善する (非特許文献5、6)。さらには、上皮成長因子受容体 (EGFR) のTKIであるゲフィチニブおよびエルロチニブは、EGFR活性化に関係するNSCLCの治療に効果がある (非特許文献7、8)。残念ながら、標的腫瘍のサブセットは、治療の最初から、対応するTKIに対して難治性であるか、あるいは、初期応答の後に耐性を持つようになる。ATP結合ポケットの形状に直接的にまたはアロステリックに影響を及ぼし、TKIの結合を妨害する標的キナーゼにおける二次変異が、治療不成功の一部の事例において検出されている (非特許文献9~12)。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Soda, M. et al. (2007) Nature 448:561-566

【非特許文献2】Mano, H. (2008) Cancer Sci. 99:2349-2355

【非特許文献3】Soda, M. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:19893-19897

【非特許文献4】Kwak, E.L. et al. (2009) J. Clin. Oncol. 27(suppl):15s (abstract

10

20

30

40

50

3509)

【非特許文献 5】Druker, B.J. et al. (2001) N. Engl. J. Med. 344:1031-1037

【非特許文献 6】Heinrich, M.C. et al. (2008) J. Clin. Oncol. 26:5360-5367

【非特許文献 7】Mok, T.S. et al. (2009) J. Clin. Oncol. 27:5080-2087

【非特許文献 8】Mok, T.S. et al. (2009) N. Engl. J. Med. 361:947-957

【非特許文献 9】Deininger, M. et al. (2005) Blood 105:2640-2653

【非特許文献 10】Kobayashi, S. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:786-792

【非特許文献 11】Pao, W. et al. (2005) PLoS Med. 2:e73

【非特許文献 12】Shah, N.P. et al. (2002) Cancer Cell 2:117-125

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

したがって、異常な発現および/または活性に関する疾患を同定、評価、予防及び治療する組成物、キット、および方法を良好に開発することを目的として、EML4-ALKなどのチロシンキナーゼに耐性を与える突然変異を同定することが緊急的に必要とされている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、既知のALK阻害剤に対し耐性を与える新しい未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)変異の同定に基づいた癌の同定、評価および治療のための、少なくとも、組成物、方法およびキットを提供する。このようなALK突然変異は、新しいALK突然変異によって生じた異常なATP結合ポケットに適合し、ALK活性を阻害することができる医薬組成物の同定にとって臨床的に意義がある。

【0009】

1つの態様では、本発明は、癌を有する、またはALK阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加した、癌を発現するリスクを有する被験体を同定する方法であって、

前記患者からサンプルを採取し、前記サンプルを分析して、1つ以上の突然変異ALKポリヌクレオチド分子の存在を検出することを含み、

前記1つ以上の突然変異ALKポリヌクレオチド分子の存在が、前記被験体の前記ALK阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加したことを示唆する方法を提供する。

【0010】

別の態様では、本発明は、癌を有するまたはALK阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加した、癌を発現するリスクを有する被験体を同定する方法であって、

前記患者からサンプルを採取し、前記サンプルを分析して、1つ以上の突然変異ALKポリペプチドの発現量、構造、および/または活性を検出することを含み、

前記1つ以上の突然変異ALKポリペプチドの存在が、前記被験体の前記ALK阻害剤を用いた治療に対する無応答性のリスクが増加したことを示唆する方法を提供する。

【0011】

本発明のいずれかの態様の一部の実施の形態では、被験体は、ALK阻害剤を用いた治療を以前に受けていないか、あるいはALK阻害剤を用いた治療を以前に受けており、前記ALK阻害剤(例えば、PF-02341066、PDD、2-メチル-11-(2-メチルプロピル)-4-オキソ-4,5,6,11,12,13-ヘキサヒドロ-2H-インダゾロ[5,4-a]ピロロ[3,4-c]カルバゾール-8-イル[4-(ジメチルアミノ)ベンジル]カルバメート、(1S,2S,3R,4R)-3-(5-クロロ-2-[(1-エチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-6-メトキシ-2-オキソ-1H-1-ベンゾアゼピン-7-イル)アミノ]-4-ピリミジニル}アミノ)ピシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-2-カルボキサミド、およびNVP-TAE684)に

10

20

30

40

50

対して少なくとも部分耐性を発現している。他の実施の形態では、癌は、未分化大細胞リンパ腫、神経芽細胞腫、乳癌、結腸直腸癌、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、および非小細胞肺癌からなる群より選択される。さらに別の実施の形態では、サンプルは、痰、気管支肺胞洗浄、胸水、組織、全血、血清、血漿、頬腔擦取物、唾液、脳脊髄液、尿、排泄物、循環腫瘍細胞、循環核酸、および骨髄からなる群より選択される。さらに別の実施の形態では、サンプルは細胞または組織を含む。一部の実施の形態では、組織は腫瘍または癌組織である。他の実施の形態では、1つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドは、表 1 記載の、突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドからなる群より選択される。さらに別の実施の形態では、1つ以上の A L K 突然変異は、核酸ハイブリダイゼーション分析によって評価される。さらに別の実施の形態では、1つ以上の A L K 突然変異はポリメラーゼ連鎖反応によって評価される。他の実施の形態では、前記 1つ以上の A L K ポリペプチドの発現量は、1つ以上の A L K ポリペプチドに特異的に結合する試薬（例えば、抗体、抗体誘導体、および抗体フラグメント）を使用して検出される。さらに別の実施の形態では、前記 1つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの量、構造および/または活性は、対照サンプルと比較される。さらに別の実施の形態では、1つ以上の A L K 突然変異は、第 1 の時点およびその後の少なくとも 1 つの時点において評価される。他の実施の形態では、サンプルは生殖細胞系または体細胞ゲノム DNA を含む。

10

【 0 0 1 2 】

さらに別の態様では、本発明は、癌を有する、または癌を発現するリスクのある患者を治療する方法であって、前記患者からサンプルを採取し、前記サンプルを分析して表 1 記載の 1つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子の存在を検出し、A L K 阻害剤を治療に有効な量で前記患者に投与することを含む、方法を提供する。一部の実施の形態では、A L K 阻害剤は、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6、P D D、2 - メチル - 1 1 - (2 - メチルプロピル) - 4 - オキソ - 4 , 5 , 6 , 1 1 , 1 2 , 1 3 - ヘキサヒドロ - 2 H - イングゾロ [5 , 4 - a] ピロロ [3 , 4 - c] カルバゾール - 8 - イル [4 - (ジメチルアミノ) ベンジル] カルバメート、(1 S , 2 S , 3 R , 4 R) - 3 - ({ 5 - クロロ - 2 - [(1 - エチル 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 6 - メトキシ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 7 - イル) アミノ] - 4 - ピリミジニル } アミノ) ビシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - カルボキサミド、および N V P - T A E 6 8 4 からなる群より選択される。他の実施の形態では、被験体は、A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けていないか、あるいは A L K 阻害剤を用いた治療を以前に受けており、前記 A L K 阻害剤に対して少なくとも部分耐性を発現している。

20

30

【 0 0 1 3 】

さらに別の態様では、本発明は、A L K 阻害剤を用いた治療に対する癌患者の化学的感受性を判定するキットであって、1つ以上の突然変異 A L K ポリヌクレオチド分子またはポリペプチドに特異的に結合する試薬；および使用説明書を含むキットを提供する。一部の実施の形態では、前記キットは、A L K 阻害剤をさらに含む。他の実施の形態では、前記試薬は 1つ以上のポリヌクレオチドプローブを含み、前記プローブのそれぞれは、表 1 に記載されるヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列、または表 1 に記載されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に相補的なポリヌクレオチド配列（例えば、オリゴヌクレオチド、c D N A 分子、R N A 分子、および核酸塩基を含む合成遺伝子プローブ）を含む。さらに別の実施の形態では、前記プローブは、約 $50 \sim 10^7$ のヌクレオチド長のポリヌクレオチドを含む。さらに別の実施の形態では、前記試薬は、表 1 に記載される 1つ以上のポリヌクレオチド配列によってコードされたポリペプチドに対する、抗体、および抗体誘導体、および抗体フラグメントを含む。

40

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本発明は、試験化合物が 1つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドの活性を調節するか否かを判定する方法であって、前記 1つ以上の突然変異 A L K ポリペプチドをコードする構成体をトランスフェクトされた哺乳動物細胞を前記試験化合物と接触させ

50

、前記哺乳動物細胞を前記1つ以上の突然変異ALKポリペプチドの活性について評価することを含み、対照実験と比べて前記試験化合物の存在下において顕著に活性が調節される場合に、前記試験化合物を前記1つ以上の突然変異ALKポリペプチドのモジュレーターとして同定することを特徴とする方法を提供する。一部の実施の形態では、1つ以上の突然変異ALKポリヌクレオチド分子またはポリペプチドは、表1記載の突然変異ALKポリヌクレオチド分子またはポリペプチドからなる群より選択される。他の実施の形態では、対照は、表1記載のポリペプチドからなる群より選択される野生型ALKポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を含む。さらに別の実施の形態では、1つ以上の突然変異ALKポリペプチドの活性は、ATP結合、チロシンキナーゼ活性、癌細胞増殖、腫瘍成長、腫瘍数、アポトーシス、および腫瘍転移からなる群より選択される。さらに別の実施の形態では、対照実験は、例えば、1つ以上の突然変異ALKポリペプチドの活性（例えば、ATP結合、チロシンキナーゼ活性、癌細胞増殖、腫瘍成長、腫瘍数、アポトーシス、および腫瘍転移）によって決定される試験化合物の不存在下で1つ以上の突然変異ALKポリペプチドを発現する哺乳動物細胞を含む。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、ALKチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性に関連した本発明の新しいALK突然変異を表している。図1Aは、EML4-ALKタンパク質の略図を示している。キナーゼドメインにおける2つのde novo変異の位置が示されており、キナーゼ領域または融合cDNAの増幅用のPCRプライマーが、上方に黒塗りおよび白抜きの矢印でそれぞれ示されている。図1Bは、ALKキナーゼ領域cDNAの大規模シーケンシング（deep sequencing）の結果を示している。GAIIシステムを用いて、NSCLC細胞株H2228由来または標本番号J-#1、J-#12、J-#113、J-#127またはLK-#33由来の1000塩基対以下のPCR産物の配列を決定した。全読み取り範囲（全体）および一致しない読み取り（不一致）の数が、キナーゼ領域cDNAの各位置にそれぞれ青色および赤色のひし形で示されている。差し込み図は、J-#1およびJ-#113用のcDNAの5'領域の拡大図を示している（緑色の四角で示す）。図1Cは、G4374とC4493の位置を取り囲むALK cDNAクロンの電気泳動図を示している。PCRは、治療前に入手した痰（初期）および再発後に入手した胸水（再発）から調製したcDNAを用いて行われた。置換Aヌクレオチドが赤色で示されている。

【図2】図2は、ALK cDNAのG4374およびC4493に対応する位置を取り囲むゲノム配列を表している。Platinum Taq DNAポリメラーゼ（Invitrogen社（米国カリフォルニア州カールズバッド所在）製）および次のプライマー（5'-GGTAAGAAGTGGCTCACTCTTGAG-3'および5'-CACAACTGCAGCAAAGACTGG-3'）を用い、患者の胸水の細胞から単離されたゲノムDNAを94 で15秒間、60 で30秒間および68 で2分間を35サイクル行うPCRに供し、産物をpT7Blue-2プラスミド（Takara Bio社製）に連結させた。次に、3130xl Genetic Analyzerを用いてプラスミド挿入物の配列を決定し、G4374A（左のパネル）またはC4493A（右のパネル）の変更を含むPCRクロンを同定した。置換Aヌクレオチドが赤色で示されている。

【図3】図3は、PF-02341066で治療したBA/F3細胞の結果を表している。EML4-ALK（野生型）、EML4-ALK（C1156Y）、EML4-ALK（L1196M）、または二重変異体であるEML4-ALK（C1156Y/L1196M）を発現するBA/F3細胞を表示された濃度のPF-02341066の存在下で48時間インキュベートし、その後、位相差顕微鏡法によって細胞形態を調べた。スケールバーは20 μmである。

【図4】図4は、ALKチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性に関連した本発明の新しいALK突然変異の特性を表している。図4Aは、表示濃度のPF-02341066を用

いて、 5×10^5 細胞を48時間インキュベートした後にカウントしたEML4-ALK (野生型)、EML4-ALK (C1156Y)、EML4-ALK (L1196M)、または二重変異体であるEML4-ALK (C1156Y/L1196M)を発現するBA/F3細胞の数を示している。野生型のEML4-ALKを発現するBA/F3細胞に対する生存細胞のパーセンテージが示されている。データは、3つの独立した実験から得られた平均±標準偏差である。図4Bは、野生型または突然変異体のEML4-ALKのチロシンリン酸化におけるPF-02341066の効果を示している。FLAGタグ化した野生型のEML4-ALKまたはその突然変異体を発現するBA/F3細胞を、表示濃度のPF-02341066に15時間曝露し、その後、EML4-ALKを細胞溶解物から免疫沈降させて、Tyr¹⁶⁰⁴-リン酸化ALKまたはFLAGエピトープに特異的な抗体を用いたイムノプロット解析に供した(ALK)。EML4-ALKの不活性変異体を発現する細胞(KM)を陰性対照として検査した。図4Cは、BA/F3細胞から免疫沈降させた、FLAGタグ化した野生型のEML4-ALKまたはその突然変異体についてのインビトロキナーゼ分析を示している(ALK阻害剤には曝露せず)。その免疫沈降物を、[³²P]ATP、合成ペプチド、および表示濃度のPF-02341066とともにインキュベートした。ペプチド基板免疫沈降物をリン酸化反応させたものを、FLAGに対する抗体を用いたイムノプロット解析に別々に供した(下のパネル)。

【図5】図5は、ALKのキナーゼドメインの三次元構造モデルを表している。ALKのアミノ酸の位置は、結合ATP類似体(ワールドワイドウェブのpdj.org/index.htmlで利用可能な日本蛋白質構造データバンク(PDBj:Protein Data Bank of Japan)におけるID「1ir3」)を有するインスリン受容体の結晶構造と重なっていた。右のパネルは、左のパネルのモデルの右側に観察されるタンパク構造を示している。らせん構造とシート構造がそれぞれ赤紫色とオレンジ色で示されている。らせんC、Cys1156、およびLeu¹¹⁹⁶の位置も表示されている。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、少なくともある程度は、癌治療におけるALK阻害剤の有効性の予測に関連した、例えば未分化リンパ腫キナーゼ(ALK)変異を含めた、ゲノムの特定部位の同定に基づいている。特に、ALK阻害剤を用いた治療に対して少なくともある程度耐性のポリペプチドにつながりうる、新規のALK遺伝子変異(例えば、EML4-ALKポリペプチドをコードする変異)が本願において特定される。本発明はさらに、限定はしないが、オリゴヌクレオチド系のマイクロアレイを含めた当技術分野で既知の技術を利用して、このような特異的ゲノム領域を同定する方法(Brennan, et al. (2004) Cancer Res. 64(14):4744-8; Lucito, et al. (2003) Genome Res. 13:2291-2305; Bignell et al. (2004) Genome Res. 14:287-295; Zhao, et al (2004) Cancer Research, 64(9):3060-71)、および、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)に基づく方法および直接配列に基づく方法などの他の方法についても提供する。本発明は、さらに、これらの方法に使用するための診断キットについても提供する。

【0017】

本発明のさまざまな態様は、次のサブセクションでさらに詳細に説明される。

【0018】

I. 定義

マーカーの「変化量」またはマーカーの「変化レベル」という用語は、対照サンプルにおけるマーカーの発現量またはコピー数と比較した、ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物(例えば、表1記載のマーカー)などのマーカーまたは染色体領域のコピー数の増減、および/または、癌サンプルにおける1つまたは複数の特定のマーカー遺伝子の発現量の増減のことをいう。マーカーの「変化量」という用語はまた、正常な対照サンプルにおけるマーカーのタンパク質レベルと比較した、例えば癌サンプルなどのサンプルにおけるマーカーのタンパク質レベルの増減も含む。

【0019】

10

20

30

40

50

A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ）の「発現の変化レベル」という用語は、発現またはコピー数の評価に用いられたアッセイの標準誤差よりも大きいまたは小さい、癌を患う患者に由来するサンプルなどの試験サンプルにおけるマーカ発現量またはコピー数のことをいい、対照サンプル（例えば、関連疾患を有しない健康な被験体から得たサンプル）における A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ）の発現量またはコピー数、または幾つかの対照サンプルにおける A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ）の平均の発現量またはコピー数の、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 の 2 倍、少なくとも 4 の 2 倍、少なくとも 5 の 2 倍、または少なくとも 10 の 2 倍またはそれ以上でありうる。発現の変化レベルは、発現またはコピー数の評価に用いられたアッセイの標準誤差よりも大きい、または小さく、対照サンプル（例えば、関連疾患を有しない健康な被験体から得たサンプル）における A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ）の発現量またはコピー数、または、幾つかの対照サンプルにおける A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ）の平均の発現量またはコピー数の少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍またはそれ以上である。

10

【 0 0 2 0 】

マーカの「活性変化」という用語は、正常な対照サンプルにおけるマーカの活性と比較して、例えば癌サンプルなどにおける病状が増減した、マーカの活性のことをいう。マーカの活性変化は、例えば、マーカの発現変化、マーカのタンパク質レベル変化、マーカの構造変化、または、例えば、マーカと同一または異なる経路に関係した他のタンパク質との相互作用の変化の結果でありうる。

20

マーカの「構造変化」という用語は、正常なまたは野生型の遺伝子またはタンパク質と比較した場合に、変異、あるいは、例えばマーカの発現または活性に影響を及ぼす変異などのマーカ遺伝子またはマーカタンパク質内の変異の存在のことをいう。例えば、変異としては、限定はしないが、染色体間および染色体内の再配置、置換、欠失、および挿入変異が挙げられる。変異は、マーカのコード領域または非コード領域に存在しうる。

【 0 0 2 1 】

「未分化リンパ腫キナーゼ」および「A L K」は、本明細書では相互に用いられ、任意の起源（例えば、齧歯動物、ヒト、および他の哺乳動物）に由来した、天然の未分化リンパ腫キナーゼ、およびそれらのある特定の変異体および変異体のことを指す。一部の実施の形態では、A L K タンパク質は、NCBI 参照配列同定番号：NP__004295 で表される。他に指定のない限り、これらの用語はヒトタンパク質を意味する。本明細書では、A L K をコードしている遺伝子も「A L K」と称される場合がある。一部の実施の形態では、A L K ヌクレオチド配列は、NCBI 参照配列同定番号：NM__004304.3 および GenBank アクセッション番号：29029631、その中の関連配列（例えば、コード、5' UTR、3' UTR、転写開始、翻訳開始、転写停止、翻訳終止などの配列）で表され、これらは、当業者には容易に確認できるであろう。

30

【 0 0 2 2 】

加えて、「未分化リンパ腫キナーゼ」および「A L K」という用語は、本明細書では、A L K 融合キナーゼおよび当業者に周知のそれらの変異体も含めて用いられる。これらの A L K 融合キナーゼおよびそれらの変異体は A L K キナーゼ活性を有し、かつ、本明細書に記載の変異を含み、A L K キナーゼ活性を A L K 阻害剤に対して耐性に変化させうる。代表的な例としては、EML4 - A L K Variant 1 (AB274722.1; BAF73611.1)、EML4 - A L K Variant 2 (AB275889.1; BAF73612.1)、EML4 - A L K Variant 3a (AB374361.1; BAG55003.1)、EML4 - A L K Variant 3b (AB374362.1; BAG55004.1)、EML4 - A L K Variant 4 (AB374363.1; BAG75147.1)、EML4 - A L K Variant 5a (AB37

40

50

4364.1; BAG75148.1)、EML4-ALK Variant 5b (AB374365.1; BAG75149.1)、EML4-ALK Variant 6 (AB462411.1; BAH57335.1)、EML4-ALK Variant 7 (AB462412.1; BAH57336.1)、KIF5B-ALK (AB462413.1; BAH57337.1)、NPM-ALK、TPM3-ALK、TFGXL-ALK、TFGL-ALK、TFGS-ALK、ATIC-ALK、CLTC-ALK、MSN-ALK、TPM4-ALK、MYH9-ALK、RANBP2-ALK、ALO17-ALK、およびCARS-ALKが挙げられる(例えば、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれるPulford et al., (2004) J. Cell. Physiol. 199:330-358を参照)。加えて、当業者は、ALKキナーゼの変異体が、ALKキナーゼおよびその融合パートナーとの特定の融合事象に応じて発現しうることを理解するであろう(例えば、EML4は、例えば参照することによってその全体が本明細書に組み込まれるHorn and Pao, (2009) J. Clin. Oncol. 27:4247-4253に記載されるように、少なくともエクソン2、6a、6b、13、14、および/または15を融合することができる)。例えば、代表的なALK配列は、本明細書において、次のように提供される：

【表 1 - 1】

表1

野生型 **ALK** の **cDNA** 配列 (**NM_004304.3; GI:29029631**) :

1 gggggcggca gcggtgtag cagctggtac ctcccggcgc ctctgttcgg agggtcgcgg
 61 ggcaccgagg tgctttccgg ccgccctctg gtcggccacc caaagccgcg ggcgctgatg
 121 atgggtgagg agggggcggc aagatttcgg gcgcccctgc cctgaacgcc ctcaactgct
 181 gccgccgggg ccgctccagt gctgcaaac tctgaggagc cgaggcgccg gtgagagcaa
 241 ggacgctgca aactgagca gcgcgggggc tgggattcac gcccagaagt tcagcaggca 10
 301 gacagtccga agccttcccc cagcggagag atagcttgag ggtgcgcaag acggcagcct
 361 ccgccctcgg ttcccggcca gaccggcag aagagcttgg aggagccaaa aggaacgcaa
 421 aaggcggcca ggacagcgtg cagcagctgg gagccgccgt tctcagcctt aaaagtgtca
 481 gagattggag gctgccccga gaggggacag accccagctc cgactgcggg gggcaggaga
 541 ggacggtacc caactgccac ctccctcaa ccatagtagt tctctgtac cgagcgcagc
 601 gagctacaga cgggggcgcg gactcggcg cggagagcgg gaggctcaag gtcccagcca
 661 gtgagcccag tgtgcttgag tctctgga ctgcccctg agcttcagg tctgttcat
 721 ttagactcct gctgcctcc gtgcagttgg gggaaagcaa gagacttgcg cgcacgcaca 20
 781 gtcctctgga gatcaggtg aaggagccgc tgggtaccaa ggactgttca gagcctctc
 841 ccatctcggg gagagcgaag ggtgaggctg ggcccggaga gcagtgtaaa cggcctctc
 901 cggcgggatg ggagccatcg ggctcctgtg gctcctgccg ctgctgctt ccacggcagc
 961 tgtgggctcc gggatgggga ccggccagcg cgcgggctcc ccagctgcgg ggccgccgct
 1021 gcagccccgg gagccactca gctactcgcg cctgcagagg aagagtctgg cagttgactt
 1081 cgtggtgccc tcgctctcc gtgtctacgc ccgggaccta ctgctccac catcctctc
 1141 ggagctgaag gctggcaggc ccgaggcccg cggtcgccta gctctggact gcgccccgt
 1201 gctcaggttg ctggggccgg cgcgggggt ctctggacc gccggttac cagccccggc 30
 1261 agaggcccg acgctgtcca ggggtctgaa gggcggctcc gtgcgcaagc tccggcgtgc
 1321 caagcagttg gtgctggagc tgggcgagga ggcgatctg gagggttgcg tcgggcccc
 1381 cggggaggcg gctgtggggc tgctccagt caatctcagc gagctgttca gttggtgat
 1441 tcgccaaggc gaagggcgac tgaggatccg cctgatgcc gagaagaagg cgtcgggaagt
 1501 gggcagagag ggaaggctgt ccgcgcaat tcgcgctcc cagccccgcc ttctctcca
 1561 gatcttcggg actggtcata gtccttga atcaccaaca aacatgcctt ctctctcc
 1621 tgattatatt acatggaatc tcacctggat aatgaaagac tcctccctt tctgtctca
 1681 tcgagccga tatggtctg agtgcagctt tgacttccc tgtgagctgg agtattcccc 40
 1741 tccactgcat gacctcagga accagagctg gtctggcgc cgcattccc cagaggaggc
 1801 ctcccagatg gacttctg atgggcctg ggcagagcgt tctaaggaga tgcccagagg
 1861 ctctttctc ctctcaaca ctcagctga ctcaagcac accatctga gtccgtgat
 1921 gaggagcagc agtgagcact gcacactggc cgtctcgggt cacaggcacc tgcagcctc
 1981 tggaaagtac attgccagc tgctgcccc caacgaggct gcaagagaga tctctctgat
 2041 gccactcca gggaagcatg gttggacagt gtcaggga agaatcgggc gtccagacaa

【表 1 - 2】

2101 cccatttcga gtggccttg aatacatctc cagtggaaac cgcagcttgt ctgcagtgga
 2161 cttcttggcc ctgaagaact gcagtgaagg aacatcccca ggctccaaga tggccttgca
 2221 gagctccttc actgtttgga atgggacagt cctccagctt gggcaggcct gtgacttcca
 2281 ccaggactgt gccaggag aagatgagag ccagatgtgc cggaaactgc ctgtggggtt
 2341 ttactgcaac ttgaagatg gcttctgtgg ctggaccca ggcaactgt cacccacac
 2401 tcctaatgg caggtcagga ccctaaagga tgcccgggtc caggaccacc aagaccatgc
 2461 tctattgctc agtaccactg atgtccccgc ttctgaaagt gctacagtga ccagtgtac 10
 2521 gtttctgca ccgatcaaga gctctccatg tgagctccga atgtctggc tcattcgtgg
 2581 agtcttgagg gaaaactgt cttgtgtgct agtggagaac aaaaccggga aggagcaagg
 2641 caggatggtc tggcatgtcg ccgctatga aggcttgagc ctgtggcagt ggatggtgtt
 2701 gcctctctc gatgtgtctg acaggttctg gctgcagatg gtcgcatggt ggggacaagg
 2761 atccagagcc atcgtggctt ttgacaatat ctccatcagc ctggactgct acctcaccat
 2821 tagcggagag gacaagatcc tgcaagaatac agcacccaaa tcaagaaacc tgtttgagag
 2881 aaacccaaac aaggagctga aaccgggga aaattcacca agacagacc ccactttga
 2941 ccctacagtt cattggctgt tcaccatg tggggccagc gggcccatg gccccacca 20
 3001 ggcacagtgc aacaacgct accagaactc caacctgagc gtggaggtgg ggagcgaggg
 3061 ccccctgaaa ggcattcaga tctggaaggt gccagccacc gacacctaca gcatctcggg
 3121 ctacggagct gctggcggga aaggcggga gaacacctg atgcggtccc acggcgtgtc
 3181 tgtgctgggc atctcaacc tggagaagga tgacatgctg tacatcctgg ttgggcagca
 3241 gggagaggac gcctgcccc gtacaaacca gttaatccag aaagtctgca ttggagagaa
 3301 caatgtgata gaagaagaaa tccgtgtgaa cagaagcgtg catgagtggg caggaggcgg
 3361 aggaggagg ggtggagcca cctacgtatt taagatgaag gatggagtgc cggtgcccct
 3421 gatcattgca gccggaggtg gtggcagggc ctacggggcc aagacagaca cgttccacc 30
 3481 agagagactg gagaataact cctcgttct agggctaac ggcaattccg gagccgagc
 3541 tgggtggagt ggctggaatg ataacttc cttgctctg gccgaaaat ctttcagga
 3601 ggggtgccacc ggaggacatt cctgccccca ggccatgaag aagtgggggt gggagacaag
 3661 aggggggttc ggaggggtg gaggggggtg ctcctcaggt ggaggaggcg gaggatatat
 3721 aggcggcaat gcagcctcaa acaatgacct cgaaatggat ggggaagatg gggtttctt
 3781 catcagtcca ctgggcatcc tgtacacccc agcttataaa gtgatggaag gccacgggga
 3841 agtgaatatt aagcattatc taaactgag tcaactgtgag gtagacgaat gtcacatgga
 3901 cctgaaagc cacaaggtca tctgcttctg tgaccaggg acggtgctgg ctgaggatgg 40
 3961 cgtctctgc attgtgtcac ccacccgga gccacacctg ccactctgc tgatctctc
 4021 tgtggtgacc tctgccctg tggccgctt ggtctggct ttctccggca tcatgattgt
 4081 gtaccgcccg aagcaccag agctgcaagc catgcagatg gagctgcaga gcctgagta
 4141 caagctgagc aagctccgca cctcgacct catgaccgac tacaaccca actactgctt
 4201 tgctggcaag acctctcca tcagtacct gaaggaggtg ccgcgaaaa acatcacct
 4261 cattcgggt ctgggcatg gcgccttgg ggaggtgat gaaggccagg tgtccggaat
 4321 gcccaacgac ccaagcccc tgcaagtggc tgtgaagacg ctgctgaag tgtgctctga

【表 1 - 3】

4381 acaggacgaa ctggatttcc tcatggaagc cctgatcatc agcaaattca accaccagaa	
4441 cattgttcgc tgattgggg tgagcctgca atccctgccc cggttcatcc tgctggagct	
4501 catggcgggg ggagacctca agtccttct cagagagacc cgccctcgcc cgagccagcc	
4561 ctctccctg gccatgctgg accttctgca cgtggctcgg gacattgcct gtggctgtca	
4621 gtattggag gaaaaccact tcatccaccg agacattgct gccagaaact gcctctgac	
4681 ctgtccaggc cctggaagag tggccaagat tggagacttc gggatggccc gagacatcta	
4741 cagggcgagc tactatagaa agggaggctg tgccatgctg ccagttaagt ggatgcccc	10
4801 agaggcctc atggaaggaa tattcacttc taaaacagac acatggtcct ttggagtgtc	
4861 gctatgggaa atctttctc ttggatata gccatacccc agcaaaagca accaggaagt	
4921 tctggagttt gtcaccagtg gaggccgat ggaccaccc aagaactgcc ctgggcctgt	
4981 ataccggata atgactcagt gctggcaaca tcagcctgaa gacaggcca actttgcat	
5041 cttttggag aggattgaat actgcacca ggaccggat gtaatcaaca ccgctttgcc	
5101 gatagaatat ggtccacttg tggaaagagga agagaaagt cctgtgaggc ccaaggaccc	
5161 tgagggggtt cctctctcc tggctctca acaggcaaaa cgggaggagg agcgagccc	
5221 agctgcccc caacctctgc ctaccacct ctctggcaag gctgcaaaga aaccacagc	20
5281 tgagagatc tctgttcgag tcctagagg gccggccgtg gaagggggac acgtgaatat	
5341 ggcattctct cagtccaacc ctcttcgga gttgacaag gtccacggat ccagaaaca	
5401 gccaccagc ttgtggaacc caacgtacgg ctctggttt acagagaaac ccacaaaaa	
5461 gaataatct atagcaaaga aggagccaca cgacaggggt aacctggggc tggagggag	
5521 ctgtactgtc ccacctaagc ttgcaactgg gagacttccg gggcctcac tgctctaga	
5581 gccctctcg ctgactgcca atatgaagga ggtacctctg ttcaggctac gtcacttccc	
5641 ttgtgggaat gtcaattacg gctaccagca acagggctg ccctagaag ccgctactgc	
5701 ccctggagct ggtcattacg aggataccat tctgaaaagc aagaatagca tgaaccagcc	30
5761 tgggccctga gctcggctgc acactcactt ctctccttg ggatccctaa gaccgtggag	
5821 gagagagagg caatggctcc tcacaaacc agagacaaaa tgtcacgttt tgtttgtgc	
5881 caacctattt tgaagtacca ccaaaaaagc tgtatttga aatgcttta gaaaggttt	
5941 gagcatgggt tcatcctatt ctttcgaaag aagaaaatat cataaaatg agtgataat	
6001 acaaggcca gatgtggtg cataaggttt ttatgcatgt ttgtgtata cttcctatg	
6061 cttcttcaa attgtgtgtg ctctgctca atgtagtcag aattagctgc ttctatgtt	
6121 catagtggg gtcatagatg tttcctgccc ttgtgatgt ggacatgagc catttgagg	
6181 gagaggggaa gaaataaag gagttattg taatgactaa aa	40

システイン以外のアミノ酸をコードする野生型 cDNA 配列の TGC (4373-4375) コドン突然変異、またはそれらの相同体における対応する突然変異。

ロイシン以外のアミノ酸をコードする野生型 cDNA 配列の CTG (4493-4495) コドン突然変異、またはそれらの相同体における対応する突然変異。

野生型 cDNA 配列の G4374A 突然変異またはそれらの相同体における対応する突然変異。

野生型 cDNA 配列 nC4493A 突然変異またはそれらの相同体における対応する突然変異。

【表 1 - 4】

野生型の ALK タンパク質配列 (NP_004295.2; GI:29029632) :

1 mgaigllwll pllstaavg sgmgtgqrag spaagpplqp replsysrlq rkslavdfvv
 61 pslfrvyard llppsssel kagrpeargs laldcapllr llgpapgvsw tagspapaea
 121 rtsrvlkgg svrkrrakq lvlelgeeai legcvgppge aavgllqfnl selfswwirq
 181 gegrlrirm pekkasevgr egrlsaaira sqprllfqif gtghsslesp tnmpspspdy
 241 ftwnltwimk dsfpflshrs ryglecsfdf pceleyppl hdlrnqswsw rripseeasq
 301 mdlldgpgae rskemprgsf llntsadsk htispwmrs ssehctlavs vhrhlqpsgr 10
 361 yiaqllphne aareillmpt pgkhgwtvlq grigrpdnfp rvaleyissg nrslsavdff
 421 alknsegts pgskmalqss ftcwngtvql lgqacdfhqd caqgedesqm crklpvgfyc
 481 nfedgfcgwt qgtlsphtpq wqvrtlkdar fqdhqdhall lsttdvpase satvtsatfp
 541 apiksspcel rmswlrvgvl rgnvslvlve nktgkeqgrm vwhvaayegl slwqwmvlp
 601 ldvsdrfwlq mvawwgqgsr aivafdnisi sldcyltisc edkilqntap ksrnlfernp
 661 nkelkpgens prqtpifdpt vhwlfttcca sgphgptqaq cnnayqnsnl svevgsegpl
 721 kgiqiwkupa tdtysisgyg aaggkkgknt mmrshgvsvl gifnlekddm lyilvgqqge
 781 dacpstnqli qkvcigennv ieeerivnrs vhwagggggg gggatyvfk m kdgvpvplii 20
 841 aaggggrayg aktdtfhper lennssvlgl ngnsaaggg ggwndntsl wagkslqega
 901 tggghscpqam kkwgwetrgg fggggggcss ggggggyigg naasndpem dgedgvsfis
 961 plgilytpal kvmeghgevn ikhylncshc evdechmdpe shkvicfdh gtvlaedgvs
 1021 civsptpeph lplslilsvv tsalvaalvl afsgimivyr rkhqelqamq melqspeyki
 1081 sklrtstimt dynpnycfag ktssidlike vprknitlir glghgafgev yegqvsmpn
 1141 dpsplqvavk tpevcseqd eldfmeali iskfnhqniv rcigvslqsl pfillelma
 1201 ggdlksflre trprsqps lamldllhva rdiacgcqyl eenhfhrdi aarnclltpc
 1261 gpgrvakigd fgmardiyra syyrkgcam lpvkwmppea fmegiftskt dtwsfgvllw 30
 1321 eifslgympy psksnqevle fvtsggrmdp pkncpgpvyr imtqcwqhqp edrpnfail
 1381 erieyctqdp dvintalpie ygplveeeek vpvprkdpeg vpllvssqqa kreespaa
 1441 ppplpttssg kaakkptaae isrvprgpa vegghvnmaf sqsnppselh kvhgsrnkpt
 1501 slwnptygsw ftekptkkn piakkephdr gnlglegsct vppnvatgrl pgasllleps
 1561 sltanmkevp lfrrhfpcg nvnygyqqqg lpleaatapg aghyedtilk sknsmnqpgp

野生型タンパク質配列 Cys1156Xaa 突然変異。ここで、Xaa はシステイン以外のアミノ酸またはそれらの相同体における対応する突然変異である。

野生型タンパク質配列 Leu1196Xaa 突然変異。ここで、Xaa はロイシン以外のアミノ酸またはそれらの相同体における対応する突然変異である。

野生型タンパク質配列 Cys1156Tyr 突然変異またはそれらの相同体における対応する突然変異。

野生型タンパク質配列 Leu1196Met 突然変異またはそれらの相同体における対応する突然変異。

40

【表 1 - 5】

EML4-ALK 変異体 1 の cDNA 配列 (AB274722.1; GI:152002652)

1 ggcggcgctg cgcggcgctc gcggtctgctg cctgggaggg aggccgggca ggcggtctgag
 61 cggcgcggtc ctcaactgta cggggaagtg gttcggggcg cgcgggctta ctacccagg
 121 gcgaacggac ggacgacgga ggcgggagcc ggtagccgag ccggggcgacc tagagaacga
 181 gcgggtcagg ctacgctgct gccactctgt cggctccgctg aatgaagtgc ccgcccctct
 241 gagcccggag cccggcgctt tccccgcaag atggacggtt tcgccggcag tctcgatgat
 301 agtatttctg ctgcaagtac ttctgatggt caagatcgcc tgtcagctct tgagtcacga 10
 361 gttcagcaac aagaagatga aatcactgtg ctaaaggcgg ctttggtgta tgttttgagg
 421 cgtcttcaa tctctgaaga tcatgtggcc tcagtgaaaa aatcagtctc aagtaaaggc
 481 caaccaagcc ctcgagcagt tattcccatg tctgtataa ccaatggaag tggtgcaaac
 541 agaaaaccaa gtcataccag tgctgtctca attgcaggaa aagaaactct tcatctgct
 601 gctaaaagtg gtacagaaaa aaagaaagaa aaaccacaag gacagagaga aaaaaaagag
 661 gaatctcatt ctaatgatca aagtccacaa attcgagcat caccttctcc ccagccctct
 721 tcacaacctc tccaaataca cagacaaact ccagaaagca agaatgctac tcccacaaa
 781 agcataaac gaccatcacc agctgaaaag tcacataatt cttgggaaaa ttcagatgat 20
 841 agccgtaata aattgtcgaa aatacctca acacccaaat taatacaaaa agttacaaa
 901 actgcagaca agcataaaga tgtcatcatc aaccaagaag gagaatata taaaatgttt
 961 atgcgctgct ggccaattac catgttcatt cctccgatg ttgacaacta tgatgacatc
 1021 agaacggaac tgctctctga gaagctcaaa ctggagtggg catatgggta tcgaggaaag
 1081 gactgtagag ctaatgttta ccttctccg accggggaaa tagtttattt cattgcatca
 1141 gtagtagtac tatttaatta tgaggagaga actcagcgac actacctggg ccatacagac
 1201 tgtgtgaaat gccttgctat acatcctgac aaaattagga ttgcaactgg acagatagct
 1261 ggctgtgata aagatggaag gcctctaca cccacgtca gagtgtggga ttctgttact 30
 1321 ctatccacac tgcagattat tggacttggc acttttgagc gtggagttag atgcctggat
 1381 tttcaaaaag cagattcagg tgttcattta tgtgttattg atgactcaa tgagcatatg
 1441 ctactgtat gggactggca gaagaaagca aaaggagcag aaataaagac acaaatgaa
 1501 gttgttttgg ctgtggagt tccaccaaca gatgcaata ccataattac atgcggtaaa
 1561 tctcatattt tcttctggac ctggagcggc aattcactaa caagaaaaca gggaaatttt
 1621 gggaaatatg aaaagccaaa atttgtgcag tgttagcat tcttggggaa tggagatggt
 1681 ctactggag actcaggtgg agtcatgctt atatggagca aaactactgt agagcccaca
 1741 cctgggaaag gacctaaagt gtaccgccgg aagcaccagg agctgcaagc catgcagatg 40
 1801 gagctgcaga gccctgagta caagctgagc aagctccgca cctcgacct catgaccgac
 1861 tacaaccca actactgctt tgctggcaag acctctcca tcagtgcct gaaggaggtg
 1921 ccgcggaaaa acatcacct cattcggggc ctgggcatg gagcctttg ggagggtgat
 1981 gaaggccagg tgtccggaat gcccaacgac ccaagcccc tgcaagtggc tgtgaagacg
 2041 ctgctgaag tgtgctctga acaggacgaa ctggatttcc tcatggaagc cctgatcatc
 2101 agcaaatca accaccagaa cattgttgc tgcattgggg tgagcctgca atccctgcc

【表 1 - 6】

2161 cggttcatcc tgctggagct catggcgggg ggagacctca agtccttctt ccgagagacc
 2221 cgccctcgcc cgagccagcc ctctcctctg gccatgctgg accttctgca cgtggctcgg
 2281 gacattgcct gtggctgtca gtatttgag gaaaaccact tcatccaccg agacattgct
 2341 gccagaaact gcctcttgac ctgtccaggc cctggaagag tggccaagat tggagacttc
 2401 gggatggccc gagacatcta cagggcgagc tactatagaa agggaggctg tgccatgctg
 2461 ccagttaagt ggatgcccc agaggccttc atggaaggaa tattcacttc taaaacagac
 2521 acatggtcct ttggagtgtc gctatgggaa atcttttctc ttggatatat gccatacccc 10
 2581 agcaaaagca accaggaagt tctggagttt gtcaccagtg gaggccggat ggaccaccc
 2641 aagaactgcc ctggcctgt ataccgata atgactcagt gctggcaaca tcagcctgaa
 2701 gacaggccca actttgccat cattttggag aggattgaat actgcacca ggaccggat
 2761 gtaatcaaca ccgctttgcc gatagaatat ggtccacttg tggaagagga agagaaagtg
 2821 cctgtgaggc ccaaggacc tgagggggtt cctcctctcc tggctctca acaggcaaaa
 2881 cgggaggagg agcgcagccc agctgcccc ccaactctgc ctaccacctc ctctggcaag
 2941 gctgcaaaga aaccacagc tgcagaggtc tctgttcgag tccttagagg gccggccgtg
 3001 gaagggggac acgtgaatat ggcattctct cagtccaacc ctcttcgga gttgcacagg 20
 3061 gtccacggat ccagaaacaa gccaccagc ttgtggaacc caacgtacgg ctctggttt
 3121 acagagaaac ccacaaaaa gaataatcct atagcaaaga aggagccaca cgagaggggt
 3181 aacctggggc tggaggggaag ctgtactgtc ccacctaacg ttgcaactgg gagacttccg
 3241 gggcctcac tgctcctaga gcctcttcg ctgactgcca atatgaagga ggtacctctg
 3301 ttcaggctac gtcacttccc ttgtgggaat gtcaattacg gctaccagca acagggcttg
 3361 cccttagaag ccgctactgc cctggagct ggtcattacg aggataccat tctgaaaagc
 3421 aagaatagca tgaaccagcc tgggccctga gctcggtcac aactcactt ctctccttg
 3481 ggatccctaa gaccgtggag gagagagagg caatcaatgg ctcttcaca aaccagagac 30
 3541 caaatgtcac gttttgttt gtgccaacct atttgaagt accacaaaa aagctgtatt
 3601 ttgaaaatgc tttagaaagg tttgagcat gggttcatcc tattcttcg aaagaagaa
 3661 atatcataaa aatgagtgat aaatacaagg ccagatgtg gttgcataag gttttatgc
 3721 atgtttgtg tatacttctt tatgcttct taaattgtg tgtgctctgc ttcaatgtag
 3781 tcagaattag ctgctctat gttcatagt tggggtcata gatgttctt tgcctgttg
 3841 atgtggacat gagccattg aggggagagg gaacggaaat aaaggagtta ttgtaatga
 3901 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa

【表 1 - 7】

EML4-ALK 変異体 1 タンパク質配列 (BAF73611.1; GI:152002653)

1 mdgfagslidd sisaastsdv qdrsalesr vqqqedeitv lkaaladvlr raisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavs iagketlssa aksgtekkke
 121 kpqqgrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknaptk sikrspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii nqegeyikmf mrgrpitmfi
 241 psdvnyddi rtelpeklk lewaygyrgk dcranvyllp tgeivyfias vvvlfnyeer
 301 tqrhylghtd cvkclaihp d kiriatgqia gvdkdgrplq phvrwdsvt lslqiiglg 10
 361 tfergygcl d fskadsgvhl cviddsnehm ltvwdwqkka kgaeiktne vvlavefhpt
 421 dantiitcgk shiffwtwsg nsltrkqgif gkyekpkfvq clafngndv ltgdsggvml
 481 iwskttept pgkgpkvyrr khqelqamqm elqspeykl s klrsttimtd ynpnycfagk
 541 tssisdikev prknitlirg lghgafgevy egqvsgmpnd psplqvavkt lpevcseqde
 601 ldflmealii skfnhqivrr cigvslqslp rfillelmag gdlksflret rprpsqpsl
 661 amldllhvar diacgcqyle enhfihrdia arnclltcbp pgrvakigdf gmardiyas
 721 yyrkggcaml pvkwmppeaf megiftsktd twsfgvllwe ifslgymyp sksnqevlef
 781 vtsggrmdpp knccpvyri mtqcwqhpe drpnfaiile rieyctqdpd vintalpiey 20
 841 gplveeeekv pvrpkdpegv ppllvsqqak reerspaap pplpttssgk aakkptaaev
 901 svrvprgpav egghvnmafs qsnppselhr vhgsrnkpts lwnptygswf tekptkknnp
 961 iakkepherg nlglegsctv ppnvatgrlp gaslllepss ltanmkevpl frlrhfpcgn
 1021 vnygyqqqgl pleaatapga ghyedtilks knsmnqpgp

【表 1 - 8】

EML4-ALK 変異体 2 の cDNA 配列 (AB275889.1; GI:152002654)

1 ggcggcgcgg cgcggcgctc gcggctgctg cctgggaggg aggccgggca ggcggctgag
 61 cggcgcggct ctcaacgtga cggggaagtg gttcgggcgg ccgcggtta ctccccagg
 121 gcgaacggac ggacgacgga ggcgggagcc ggtagccgag ccgggacgacc tagagaacga
 181 gcgggtcagg ctacgctcg gccactctgt cggctcgtg aatgaagtgc ccgccctct
 241 gagcccggag cccggcgctt tccccgaag atggacggtt tcgccggcag tctcgatgat
 301 agtatttctg ctgcaagtac ttctgatgtt caagatcgcc tgtcagctct tgagtcacga 10
 361 gttcagcaac aagaagatga aatcactgtg ctaaaggcgg ctttggtga tgtttgagg
 421 cgtcttcaa tctctgaaga tcatgtggcc tcagtgaaaa aatcagtctc aagtaaaggc
 481 caaccaagcc ctgagcagt tattccatg tctgtataa ccaatggaag tggtgcaaac
 541 agaaaaccaa gtacataccag tgctgtctca attgcaggaa aagaaactct tcatctgct
 601 gctaaaagtg gtacagaaaa aaagaaagaa aaaccacaag gacagagaga aaaaaagag
 661 gaatctcatt ctaatgatca aagtccacaa attcgagcat caccttctcc ccagccctct
 721 tcacaacctc tcaaataca cagacaaact ccagaaagca agaatgctac tcccacaaa
 781 agcataaac gaccatcacc agctgaaaag tcacataatt cttgggaaaa ttcagatgat 20
 841 agccgtaata aattgtcgaa aatacctca acaccaaata taatacaaaa agttacaaa
 901 actgcagaca agcataaaga tgatcatc accaagaag gagaatata taaaatgttt
 961 atgcgcggtc ggccaattac catgttcatt cctccgatg tgacaacta tgatgacatc
 1021 agaacggaac tgccctctga gaagctcaaa ctggagtggg catatggta tcgaggaaag
 1081 gactgtagag ctaatgttta ccttctccg accggggaaa tagttattt cattgcatca
 1141 gtagtagtac tatttaatta tgaggagaga actcagcagc actacctggg ccatacagac
 1201 tgtgtgaaat gccttctat acatcctgac aaaattagga ttgcaactgg acagatagct
 1261 ggcgtggata aagatggaag gccttcaaa cccacgtca gagtgtggga ttctgttact 30
 1321 ctatccacac tgagattat tggactggc acttttgagc gtggagtagg atgcctggat
 1381 tttcaaaaag cagattcagg tgttcatta tgtgtattg atgactcaa tgagcatatg
 1441 ctactgtat gggactggca gaagaaagca aaaggagcag aaataaagac aacaaatgaa
 1501 gttgttttg ctgtggagt tcaccaaca gatgcaata ccataattac atgcggtaaa
 1561 tctcatattt tcttctggac ctggagcggc aattactaa caagaaaaca ggaattttt
 1621 gggaaatag aaaagccaaa atttgtgag tgttagcat tctggggaa tggagatgtt
 1681 ctactggag actcaggtg agtcatgctt atatggagca aaactactgt agagcccaca
 1741 cctgggaaag gacctaaag gtatatcaa atcagcaaac aatcaaagc tcatgatggc 40
 1801 agtgtgttca cactttgca gatgagaaat gggatgttat taactggagg agggaaagac
 1861 agaaaaataa ttctgtggga tcatgatctg aatcctgaaa gagaaataga gttcctgat
 1921 cagtatggca caatcagagc ttagcagaa ggaaaggcag atcaatttt agtaggcaca
 1981 tcacgaaact ttatttacc aggaacattt aatgatggct tcaaataga agtacagggt

【表 1 - 9】

2041 catacagatg agctttgggg tcttgccaca catccctca aagatttgct cttgacatgt
 2101 gctcaggaca ggcaggtgtg cctgtggaac tcaatggaac acaggctgga atggaccagg
 2161 ctggtagatg aaccaggaca ctgtgcagat tttcatcaa gtggcacagt ggtggccata
 2221 ggaacgcact caggcaggtg gtttgttctg gatgcagaaa ccagagatct agtttctatc
 2281 cacacagacg ggaatgaaca gctctctgtg atgcgctact caatagatgg taccttctctg
 2341 gctgtaggat ccatgacaa ctttatttac ctctatgtag tctctgaaaa tggaagaaaa
 2401 tatagcagat atggaagggtg cactggacat tccagctaca tcacacacct tgactggctc 10
 2461 ccagacaaca agtatataat gtctaactcg ggagactatg aatattgta cttgtaccgc
 2521 cggaagcacc aggagctgca agccatgcag atggagctgc agagccctga gtacaagctg
 2581 agcaagctcc gcacctgac catcatgacc gactacaacc ccaactactg ctttgctggc
 2641 aagacctct ccatcagtgga cctgaaggag gtgccgcgga aaaacatcac cctcattcgg
 2701 ggtctgggcc atggagcctt tggggaggtg tatgaaggcc aggtgtccgg aatgccaac
 2761 gaccaagcc ccctgcaagt ggctgtgaag acgctgctg aagtgtgctc tgaacaggac
 2821 gaactggatt tcctcatgga agccctgatc atcagcaaat tcaaccacca gaacattggt
 2881 cgctgcattg ggggtgagcct gcaatccctg ccccggttca tctgtctgga gctcatggcg 20
 2941 gggggagacc tcaagtcctt cctccgagag acccgccctc gcccgagcca gcctcctcc
 3001 ctggccatgc tggaccttct gcacgtggct cgggacattg cctgtggctg tcagtatttg
 3061 gagaaaacc acttcatcca ccgagacatt gctgccagaa actgcctctt gacctgtcca
 3121 ggccctggaa gagtggccaa gattggagac ttcgggatgg cccgagacat ctacagggcg
 3181 agtactata gaaagggagg ctgtgccatg ctgccagtta agtggatgcc cccagaggcc
 3241 tcatggaag gaatattcac ttctaaaaca gacacatggt ctttggagt gctgctatg
 3301 gaaatcttt ctcttgata tatgccatac cccagcaaaa gcaaccagga agttctggag
 3361 tttgtacca gtggaggccg gatggacca cccaagaact gccctgggcc tgtataaccg 30
 3421 ataatgactc agtgctggca acatcagcct gaagacaggc ccaactttgc catcatttg
 3481 gagaggattg aatactgcac ccaggaccgg gatgtaatca acaccgctt gccgatagaa
 3541 tatggtccac ttgtggaaga ggaagagaaa gtgcctgtga ggccaagga ccctgagggg
 3601 gttcctctc tctgtgtc tcaacaggca aaacgggagg aggagcgag cccagctgcc
 3661 ccaccctc tgctaccac ctctctggc aaggctgca agaaaccac agctgcagag
 3721 gtctgttc gactcctag agggccggcc gtggaagggg gacacgtgaa tatggcattc
 3781 tctcagtcca acctcctc ggagttgcac aggtccacg gatccagaaa caagcccacc
 3841 agcttggtga acccaacgta cggctcctgg ttacagaga aaccaccaa aaagaataat 40
 3901 cctatagcaa agaaggagcc acacgagagg ggtaacctgg ggctggaggg aagctgtact
 3961 gtccaccta acgttgaac tgggagactt ccggggcct cactgctct agagccctc
 4021 tcgctgactg ccaatatgaa ggaggtacct ctgttcaggc tacgtcactt ccctgtggg
 4081 aatgtcaatt acggctacca gcaacagggc ttgcccttag aagccgctac tgcccctgga
 4141 gctggtcatt acgaggatac cattctgaaa agcaagaata gcatgaacca gcctgggcc

【表 1 - 1 0】

4201 tgagctcggg cacacactca cttctctcc ttgggatccc taagaccgtg gaggagagag
 4261 aggcaatcaa tggctccttc acaaaccaga gaccaaagt cacgtttgt tttgtgcaa
 4321 cctatttga agtaccacca aaaaagctgt atttgaaaa tgcttagaa aggtttgag
 4381 catgggttca tcctattct tcgaaagaag aaaatatcat aaaaatgagt gataatata
 4441 aggccagat gtggttgc atagggttta tgcattgtt ttgtatact ccttatgctt
 4501 ctttaaat gtgtgtgct tgctcaatg tagtcagaat tagctgctc tatgttcat
 4561 agttggggtc atagatgtt cctgccttg ttgatgtga catgagccat ttgaggggag 10
 4621 agggaacgga aataaaggag ttattgtaa tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

【表 1 - 1 1】

EML4-ALK 変異体 2 タンパク質配列 (BAF73612.1; GI:152002655)

1 mdgfagsldd sisaastdv qdrsalesr vqqqedeiv lkaaladvr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavs iagketlssa aksgtekkke
 121 kpggqrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknaptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii nqegeyikmf mrgrpitmfi 20
 241 psdvdnyddi rtelpeklk lewaygyrgk dcranvllp tgeivyfias vvlfnyeer
 301 tqrhylghtd cvkclaihpd kiriatgqia gvdkdgrplq phvrwdsvt lslqiiigl
 361 tfergygld fskadsgvhl cviddsnehm ltwdwqkka kgaeikttne vvlavefhpt
 421 dantiitcgk shiffwtwsg nsltrkqgif gkyekpkfvq clafngndv ltdsggvml
 481 iwskttvept pgkgpkgyvq iskqikahdg svftlcqmrn gmlltgggkd rkiilwdhdl
 541 npereievpd qygitraevae gkadqflvgt srnfilrgtf ndgfqievqg htdelwglat
 601 hpfkdlitc aqdrqvclwn smehrlwtr lvdepgcad fhpsgtvai gthsgrwfvl
 661 daetrdlsvi htdgneqlsv mrysidgtfl avgshdnfiy lyvvsengr ysrygrctgh 30
 721 ssyithdws pdnkyimsns gdeilylyr rkhqelqamq melqspeykl sklrtstimt
 781 dynpnycfag ktssislke vprknitlir glghgafgev yegqvsgmpn dpsplqvavk
 841 tpevcseqd eldfmeali isfnhqniv rcigvslqsl prfillelma ggdlksflre
 901 trprsqps lamdlhva rdiacgcqyl eenhfhrdi aarncltcp gpgrvakigd
 961 fgmarkiyra syrkggcam lpvkwmppea fmegiftskt dtwsfgvllw eifslgymy
 1021 psksnqevle fvtsggrmdp pkncpgpvyr imtqcwqhqp edrpnfaiil erieyctqdp
 1081 dvintalpie ygplveeek vpvprkdepeg vpplvsqqa kreespaa ppplpttsg
 1141 kaakkptaee vsrvprgpa vegghvnmf sqsnppselh rvhgsrnkpt slwnptygsw
 1201 ftekptkkn piakkepher gnllegsct vppnvatgrl pgasllleps sltanmkevp 40
 1261 flrlrhpcg nvnygyqqqg lpleaatapg aghyedtilk sknsnqpgp

【表 1 - 1 2】

EML4-ALK 変異体 3a 核酸配列 (AB374361.1; GI:194072592)

1 actctgtcgg tccgctgaat gaagtgcccg cccctctaag cccggagccc ggcgctttcc
61 ccgcaagatg gacggtttcg ccggcagtct cgatgatagt atttctgctg caagtacttc
121 tgatgttcaa gatcgctgtg cagctcttga gtcacgagtt cagcaacaag aagatgaaat
181 cactgtgcta aaggcggcct tggctgatgt tttgaggcgt cttgcaatct ctgaagatca
241 tgtggcctca gtgaaaaaat cagtctcaag taaaggccaa ccaagccctc gagcagttat
301 tcccatgtcc tgtataacca atggaagtgg tgcaaacaga aaaccaagtc ataccagtgc
361 tgtctcaatt gcaggaaaag aaactctttc atctgctgct aaaagtggtc cagaaaaaaa
421 gaaagaaaaa ccacaaggac agagagaaaa aaaagaggaa tctcattcta atgatcaaag
481 tccacaaatt cgagcatcac cttctccca gccctcttca caacctctcc aaatacacag
541 acaaactcca gaaagcaaga atgctactcc caccaaaagc ataaaacgac catcaccagc
601 tgaaaagtca cataattctt gggaaaattc agatgatagc cgtaataaat tgtcgaaaat
661 accttcaaca cccaaattaa taccaaaagt taccaaaact gcagacaagc ataaagatgt

【表 1 - 1 3】

721 catcatcaac caagtgtacc gccggaagca ccaggagctg caagccatgc agatggagct
 781 gcagagccct gagtacaagc tgagcaagct ccgcacctcg accatcatga ccgactacaa
 841 cccaactac tgctttgctg gcaagacctc ctccatcagt gacctgaagg aggtgccgcg
 901 gaaaaacatc accctcattc ggggtctggg ccatggagcc ttgggggagg tgatgaagg
 961 ccaggtgtcc ggaatgccca acgaccaag cccctgcaa gtggctgtga agacgtgccc
 1021 tgaagtgtgc tctgaacagg acgaactgga tttctcatg gaagccctga tcatcagcaa
 1081 attcaaccac cagaacattg ttcgctgcat tggggtgagc ctgcaatccc tgccccggtt 10
 1141 catcctgctg gagctcatgg cggggggaga cctcaagtcc ttctccgag agacccgcc
 1201 tcgcccgagc cagccctcct cctggccat gctggacctt ctgcacgtgg ctgggacat
 1261 tgctgtggc tgcagtatt tggaggaaaa ccattcatc caccgagaca ttgctgccag
 1321 aaactgctc ttgacctgc caggccctgg aagagtggcc aagattggag acttcgggat
 1381 ggcccagagc atctacaggg cgagctacta tagaaagga ggctgtgcca tgctgccagt
 1441 taagtggatg ccccagagg cttcatgga aggaatattc acttctaaaa cagacacatg
 1501 gtcctttgga gtgctgctat gggaaatctt ttctctgga tatatgcat accccagcaa
 1561 aagcaaccag gaagtctgg agttgtcac cagtggaggc cggatggacc cacccaagaa 20
 1621 ctgccctggg cctgtatacc ggataatgac tcagtgtgga caacatcagc ctgaagacag
 1681 gcccaacttt gccatcattt tggagaggat tgaatactgc acccaggacc cggatgtaat
 1741 caacaccgct ttgccgatag aatatgttcc acttgtggaa gaggaagaga aagtgcctgt
 1801 gaggccaag gacctgagg gggttctcc tctctgtg tctcaacagg caaacggga
 1861 ggaggagcgc agcccagctg cccaccacc tctgctacc acctcctctg gcaaggctgc
 1921 aaagaaacc acagctgcag aggtctctgt tcgagtcct agagggccgg ccgtggaagg
 1981 gggacacgtg aatatggcat tctctcagtc caaccctct tcggagttgc acaggttcca
 2041 cggatccaga aacaagccca ccagcttggt gaaccaacg tacggctcct ggtttacaga 30
 2101 gaaaccacc aaaaagaata atcctatagc aaagaaggag ccacacgaga ggggtaacct
 2161 ggggctggag ggaagctgta ctgtcccacc taacgttgca actgggagac ttccgggggc
 2221 ctactgctc ctgagccct cttcgtgac tgccaatatg aaggaggtac ctctgtttag
 2281 gctacgtcac ttccctgtg ggaatgtcaa ttacggctac cagcaacagg gcttgcctt
 2341 agaagccgct actgccctg gagctgtgca ttacgaggat accattctga aaagcaagaa
 2401 tagcatgaac cagcctgggc cctgagctcg gtcgcacact cacttctct cttgggatc
 2461 cctaagaccg tgg

【表 1 - 1 4】

EML4-ALK 変異体 3a タンパク質配列 (BAG55003.1; GI:194072593)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrlsalesr vqqqedeitv lkaaladvlr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavs iagketlssa aksgtekkke
 121 kpqqgrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrtq pesknatptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii nqvyrkhqe lqamqmelqs
 241 peyklsklrt stimtdynpn ycfagktssi sdlkevprkn itlirglghg afgevyegqv
 301 sgmpndpspl qvavktlpev cseqdeldfl mealiiskfn hqnivrcigv slqslprfil 10
 361 lelmaggdlk sflretrprp sqpsslamld llhvardiac gcqyleenhf ihrdiaarnc
 421 lltcpgpgrv akigdfgmar diyrasyyrk ggcamlpvkw mppeafmegi ftsktdtwsf
 481 gvllweifsl gymypysksn qevlefvtsq grmdppkncp gpvyrimtqc wqhqpdrpn
 541 faileriey ctqdpdvint alpieygpv eeeekvpvrp kdpegvppll vsqqakreee
 601 rspaappplp ttssgkaakk ptaaevsrv prgpaveggh vnmafsqsnp pselhrvhgs
 661 rnkptslwnp tygswftekp tkknpiakk ephergnlgl egstcvppnv atgrlpgasl
 721 llepssltan mkevplfrlr hfpcgnvnyg yqqqglplea atapgaghye dtilksknsm
 781 nqpgp 20

【表 1 - 1 5】

EML4-ALK 変異体 3b 核酸配列 (AB374362.1; GI:194072594)

1 actctgtcgg tccgctgaat gaagtgcccg ccctctaag cccggagccc ggcgctttcc
 61 ccgcaagatg gacggtttcg ccggcagtct cgatgatagt atttctgctg caagtacttc
 121 tgatgttcaa gatcgctgt cagctcttga gtcacgagtt cagcaacaag aagatgaaat
 181 cactgtgcta aaggcggcct tggctgatgt tttgaggcgt cttgcaatct ctgaagatca
 241 tgtggcctca gtgaaaaaat cagtctcaag taaaggccaa ccaagccctc gagcagttat
 301 tcccatgtcc tgtataacca atggaagtgg tgcaaacaga aaaccaagtc ataccagtgc 10
 361 tgtctcaatt gcaggaaaag aaactcttc atctgctgct aaaagtggta cagaaaaaaa
 421 gaaagaaaa ccacaaggac agagagaaaa aaaagaggaa tctcattcta atgatcaaag
 481 tccacaaatt cgagcatcac ctctccca gccctctca caacctctcc aaatacacag
 541 aaaaactcca gaaagcaaga atgtactcc cacaaaagc ataaaacgac catcaccagc
 601 tgaaaagtca cataattctt gggaaaattc agatgatagc cgtaataaat tgcgaaaat
 661 acctcaaca ccaaattaa taccaaaagt taccaaaact gcagacaagc ataaagatgt
 721 catcatcaac caagcaaaaa tgcactcg gaaaaaac agccaagtgt accgccggaa
 781 gcaccaggag ctgcaagcca tgcagatgga gctgcagagc cctgagtaca agctgagcaa 20
 841 gctccgacc tcgaccatca tgaccgacta caacccaac tactgctttg ctggcaagac
 901 ctctccatc agtgacctga aggaggtgcc gcggaaaaac atcacctca ttcggggct
 961 gggccatgga gccttgggg aggtgatga aggccagtg tccggaatgc ccaacgacct
 1021 aagccccctg caagtggctg tgaagacgct gcctgaagtg tgctctgaac aggacgaact
 1081 ggatttctc atggaagccc tgatcatcag caaattcaac caccagaaca ttgtcgtg
 1141 cattgggggtg agctgcaat cctgccccg gttcatctg ctggagctca tggcggggg
 1201 agacctcaag tccttctcc gagagaccg cctcgcccc agccagccct cctcctggc
 1261 catgctggac ctctgcacg tggctcgga cattgctgt ggctgtcagt atttggagga 30
 1321 aaaccactc atccaccgag acattgctgc cagaaactgc ctctgacct gtccaggccc
 1381 tggaagagtg gcaagattg gagactcgg gatggcccga gacatctaca gggcgagcta
 1441 ctatagaaag ggaggctgtg ccatgctgcc agttaagtgg atgccccag aggccttcat
 1501 ggaaggaata ttcacttcta aaacagacac atggtcctt ggagtgtgc tatgggaaat
 1561 ctttctctt ggatatatgc cataccccag caaaagcaac caggaagttc tggagttgt
 1621 caccagtga ggccgatgg acccaccaa gaactgcct ggcctgtat accggataat
 1681 gactcagtgc tggcaacatc agcctgaaga caggccaac tttgcatca ttttgagag
 1741 gattgaatac tgcaccagg acccgatgt aatcaacacc gcttgccga tagaatatg 40
 1801 tccactgtg gaagaggaag agaaagtgc tgtgaggccc aaggacctg agggggttc
 1861 tcctctctg gtctctaac aggcaaacg ggaggaggag cgcagcccag ctgccccacc
 1921 acctctgct accactctc ctggcaaggc tgcaaagaaa cccacagctg cagaggtctc
 1981 tgttcgagtc ctagagggc cgccgtgga agggggacac gtgaatatgg cattctctca

【表 1 - 1 6】

2041 gtccaaccct ccttcggagt tgcacagggt ccacggatcc agaaacaagc ccaccagctt
 2101 gtggaaccca acgtacggct cctggtttac agagaaaccc accaaaaaga ataatcctat
 2161 agcaaagaag gagccacacg agaggggtaa cctggggctg gagggaagct gtactgtccc
 2221 acctaacggt gcaactggga gacttccggg ggcctcactg ctctagagc cctcttcgct
 2281 gactgccaat atgaaggagg tacctctgtt caggctacgt cacttcctt gtgggaatgt
 2341 caattacggc taccagcaac agggcttgcc cttagaagcc gctactgccc ctggagctgg
 2401 tcattacgag gataaccattc tgaaaagcaa gaatagcatg aaccagcctg ggcctgagc 10
 2461 tcggtcgac actcacttct cttcctggg atccctaaga ccgtagg

【表 1 - 1 7】

EML4-ALK 変異体 3b タンパク質配列 (BAG55004.1; GI:194072595)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrsalesr vqqqedeitv lkaaladvlr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavv iagketlssa aksgtekkke
 121 kpqgqrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknaptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii nqakmstrek nsqvyrrkhq 20
 241 elqamqmelq speyklslr tstimtdynp nycfagktss isdlkevprk nitlirglgh
 301 gafgevyegq vsgmpndpsp lqvavktlpe vcseqdeldf lmealiiskf nhqnivrcig
 361 vslqslprfi llelmaggdl ksflretrpr psqpsslaml dllhvardia cgqyleenh
 421 fihrdiaarn cltccpggr vakigdfgma rdiyrasyr kggcamlpvk wmppeafmeg
 481 iftsktdtws fgvllweifs lgympypskv nqevlefvtv ggrmdppknc pgpvyrmtq
 541 cwqhqpdrp nfaiilerie yctqdpdvin talpieygpl veeekvpvr pkdpegvppl
 601 lvsqqakree erspaapppl pttssgkaak kptaaevsvr vprgpavegg hvnmafsqsn
 661 ppselhrvhg srnkptslwn ptygswftek ptkknnpiak kephergnlg legscvppn 30
 721 vatgrlpgas llepsslta nmkevplfrl rhfpcgnvny gyqqqglple aatapgaghy
 781 edtilkskns mnqpgp

【表 1 - 1 8】

EML4-ALK 変異体 4 核酸配列 (AB374363.1; GI:209837703)

1 actctgtcgg tccgctgaat gaagtgcccg cccctctaag cccggagccc ggcgctttcc
 61 ccgcaagatg gacggtttcg ccggcagtct cgatgatagt atttctgctg caagtacttc
 121 tgatgttcaa gatcgcctgt cagctcttga gtcacgagtt cagcaacaag aagatgaaat
 181 cactgtgcta aaggcggctt tggctgatgt tttgaggcgt cttgcaatct ctgaagatca
 241 tgtggcctca gtgaaaaaat cagtctcaag taaaggccaa ccaagccctc gagcagttat
 301 tcccatgtcc tgtataacca atggaagtgg tgcaaacaga aaaccaagtc ataccagtgc 10
 361 tgttcaatt gcaggaaaag aaactcttc atctgctgct aaaagtggta cagaaaaaaa
 421 gaaagaaaa ccacaaggac agagagaaaa aaaagaggaa tctcattcta atgatcaaag
 481 tccacaaatt cgagcatcac ctctcccca gcctcttca caacctctc aaatacacag
 541 acaaactcca gaaagcaaga atgctactcc cacaaaagc ataaaacgac catcaccagc
 601 tgaaaagtca cataattctt gggaaaattc agatgatagc cgtaataaat tgcgaaaat
 661 acctcaaca ccaaattaa taccaaaagt taccaaaact gcagacaagc ataaagatgt
 721 catcatcaac caagaaggag aatatattaa aatgtttatg cgcggtcggc caattacat
 781 gttcattcct tccgatgtg acaactatga tgacatcaga acggaactgc ctctgagaa 20
 841 gctcaaactg gagtgggcat atggttatcg aggaaaggac tgtagagcta atgtttacct
 901 tctccgacc ggggaaatag tttattcat tgcacagta gtagtactat ttaattatga
 961 ggagagaact cagcgacact acctgggcca tacagactgt gtgaaatgcc ttgtataca
 1021 tctgacaaa attaggattg caactggaca gatagctggc gtggataaag atggaaggcc
 1081 tctacaacc cacgtcagag tgtgggattc tgttactcta tccacactgc agattattgg
 1141 acttggcact tttgagcgtg gtagtagatg cctggattt tcaaagcag atcaggtgt
 1201 tcatttatgt gttattgatg actccaatga gcatatgctt actgtatggg actggcagag
 1261 gaaagcaaaa ggagcagaaa taaagacaac aatgaagtt gtttggctg tggagttca 30
 1321 cccaacagat gcaaatacca taattacatg cggtaaatct catatttct tctggacctg
 1381 gagcggcaat tcaactaaa gaaaacaggg aatttttggg aatatgaaa agccaaaatt
 1441 tgtgcagtgt ttgacttct tggggaatgg agatgttctt actggagact caggtggagt
 1501 catgcttata tggagcaaaa ctactgtaga gccacacct gggaaaggac ctaaaggtgt
 1561 atatcaatc agcaacaaa tcaaagctca tgatggcagt gtgtcacac tttgtcagat
 1621 gagaaatggg atgtattaa ctggaggagg gaaagacaga aaaataattc tgtgggatca
 1681 tgatctgaat cctgaaagag aaatagagat atgctggatg agcctgagt acaagctgag
 1741 caagctccgc acctcgacca tcatgaccga ctacaacccc aactactgct ttgctggcaa 40
 1801 gacctctcc atcagtgacc tgaaggaggt gcccgggaaa aacatcacc tcattcgggg
 1861 tctgggcat ggagccttg gggaggtgta tgaaggccag gtgtccggaa tgccaacga
 1921 cccaagcccc ctgcaagtgg ctgtgaagac gctgcctgaa gtgtgctctg aacaggacga
 1981 actggatttc ctatggaag ccctgatcat cagcaaattc aaccaccaga acattgttcg
 2041 ctgcattggg gtgagcctgc aatccctgcc ccggttcac ctgctggagc tcatggcggg
 2101 gggagacctc aagtccttcc tccgagagac ccgacctgc ccgagccagc cctctcct

【表 1 - 1 9】

2161 ggccatgctg gaccttctgc acgtggctcg ggacattgcc tgtggctgtc agtatttggg
 2221 ggaaaaccac tcatccacc gagacattgc tgccagaaac tgctcttga cctgtccagg
 2281 ccctggaaga gtggccaaga ttggagactt cgggatggcc cgagacatct acagggcgag
 2341 ctactataga aaggagggtg gtgcatgct gccagttaag tggatgcccc cagaggcctt
 2401 catggaagga atattcactt ctaaacaga cacatggtcc ttggagtgc tgctatggga
 2461 aatcttttct cttgatata tgccataccc cagcaaaagc aaccaagaag ttctggagtt
 2521 tgtcaccagt ggaggccgga tggaccacc caagaactgc cctgggctg tataccggat 10
 2581 aatgactcag tgctggcaac atcagcctga agacaggccc aactttgcca tcattttgga
 2641 gaggattgaa tactgcaccc aggaccgga tgtaatcaac accgcttgc cgatagaata
 2701 tggccactt gtggaagagg aagagaaagt gctgtgagg cccaaggacc ctgagggggg
 2761 tcctcctctc ctggtctctc aacaggcaa acgggaggag gagcgagcc cagctgcccc
 2821 accacctctg cctaccacct cctctggcaa ggctgcaaag aaaccacag ctgcagaggt
 2881 ctctgttcga gtcctagag ggccggccgt ggaaggggga cacgtgaata tggcattctc
 2941 tcagtccaac cctcctcgg agttgcacag ggtccacgga tccagaaaca agcccaccag
 3001 cttgtggaac ccaacgtacg gctcctggtt tacagagaaa cccacaaaa agaataatcc 20
 3061 tatagcaaag aaggagccac acgagagggg taacctgggg ctggagggaa gctgtactgt
 3121 cccacctaac gttgcaactg ggagacttcc gggggcctca ctgctcctag agcccttctc
 3181 gctgactgcc aatatgaagg aggtacctct gttcaggcta cgctacttcc cttgtgggaa
 3241 tgcaattac ggctaccagc aacagggtt gcccttagaa gccgctactg cccctggagc
 3301 tggcattac gaggatacca ttctgaaaag caagaatagc atgaaccagc ctgggcccctg
 3361 agctcggctc cacactcact tcttctctt gggatcccta agaccgtgg

【表 1 - 2 0】

EML4-ALK 変異体 4 タンパク質配列 (BAG75147.1; GI:209837704)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrisalesr vqqqedeitv lkaaladvlr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavs iagketlssa aksgtekkke
 121 kpqqgrekke eshndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknaptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii nqegeyikmf mrgrpitmfi
 241 psdvdnyddi rtelppeklk lewaygyrgk dcranvyllp tgeivyfias vvlfnyeer
 301 tqrhylghtd cvkclaihpd kiriatgqia gvdkdgrplq phvrwdsvt lstlqiiglg 10
 361 tfergvglcd fskadsgvhl cviddsnehm ltvwdwqrka kgaeikttne vvlavefhpt
 421 dantiitcgk shiffwtwsg nsltrkqgif gkyekpkfvq clafngngdv ltgdsggvml
 481 iwskttvept pgkgpkgyvq iskqikahdg svftlcqmrn gmlltgggkd rkiiwdhdl
 541 npereieicw mspeyklskl rstimtdyn pnycfagkts sisdlkevpr knitlirglg
 601 hgafgevyeg qvsgmpndps plqvavktlp evcseqdeld flmealiisk fnhqnivrci
 661 gvslqslprf illelmaggd lksflretrp rpsqpsslam ldllhvardi acgcqyleen
 721 hfihrdiaar nclltcpgpg rvakigdfgm ardiyrasy rkggcamlpv kwmppeafme
 781 giftsktdtw sfgvllweif slgympypsk snqevlevt sggrmdppkn cpgpvyrimt 20
 841 qcwqhapedr pnfaiileri eyctqdpdvi ntalpieygp lveeeekvpv rpkdpegvpp
 901 llvsqqakre eerspaapp lpttssgkaa kkptaaevsv rvprgpaveg ghvnmafsqs
 961 nppselhrvh gsrnkptslw nptygswfte kptkknnpia kkephergnl glegsctvpp
 1021 nvatgrlpga sllepsslt anmkevplfr lrhfpcgnvn ygyqqqglpl eaatapgagh
 1081 yedtilkskn smnqpgp

【表 1 - 2 1】

EML4-ALK 変異体 5a 核酸配列 (AB374364.1; GI:209837705)

1 actctgtcgg tccgctgaat gaagtgcccg cccctctaag cccggagccc ggcgctttcc
 61 ccgcaagatg gacggtttcg ccggcagtct cgatgatagt atttctgctg caagtacttc
 121 tgatgttcaa gatcgcctgt cagctcttga gtcacgagtt cagcaacaag aagatgaaat
 181 cactgtgcta aaggcggcct tggctgatgt ttgaggcgt cttgcaatct ctgaagatca
 241 tgtggcctca gtgaaaaaat cagtctcaag taaagtgtac cgccggaagc accaggagct
 301 gcaagccatg cagatggagc tgcagagccc tgagtacaag ctgagcaagc tccgcacctc 10
 361 gaccatcatg accgactaca accccaacta ctgctttgct ggcaagacct cctccatcag
 421 tgacctgaag gaggtgccg gcgaaaaacat caccctcatt cggggctctg gccatggagc
 481 ctttggggag gtgtatgaag gccaggtgtc cggaatgcc aacgacccaa gccccctgca
 541 agtggctgtg aagacgctgc ctgaagtgtg ctctgaacag gacgaactgg atttctcat
 601 ggaagccctg atcatcagca aaltcaacca ccagaacatt gttcgctgca ttgggggtgag
 661 cctgcaatcc ctgccccggg tcatcctgct ggagctcatg gcgggggggag acctcaagtc
 721 cttctccga gagaccgcc ctcgcccgag ccagccctcc tcctggcca tgctggacct
 781 tctgcacgtg gctcgggaca ttgcctgtgg ctgtcagtat ttggaggaaa accacttcat 20
 841 ccaccgagac attgtgcca gaaactgcct cttgacctgt ccaggccctg gaagagtggc
 901 caagattgga gacttcggga tggccccgaga catctacagg gcgagctact atagaaaggg
 961 aggctgtgcc atgctgccag ttaagtggat gccccagag gccttcatgg aaggaatatt
 1021 cacttctaaa acagacacat ggtcctttgg agtgctgcta tgggaaatct tttctctgg
 1081 atatatgcca taccagca aaagcaacca ggaagttctg gagtttgc caagtggagg
 1141 ccggatggac ccaccaaga actgccctgg gcctgtatac cggataatga ctcagtctg
 1201 gcaacatcag cctgaagaca ggcccaactt tgccatcatt ttggagagga ttgaatactg
 1261 caccaggac ccggatgtaa tcaacaccgc tttgccgata gaatatggc cactgtgga 30
 1321 agaggaagag aaagtgcctg tgaggcccaa ggaccctgag ggggttctc ctctcctgt
 1381 ctctcaacag gaaaaacggg aggaggagcg cagcccagct gcccaccac ctctgctac
 1441 cacctctct ggcaaggctg caaagaaacc cacagctgca gaggtctctg ttcgagtccc
 1501 tagagggccg gccgtggaag ggggacacgt gaatatggca ttctctcagt ccaaccctcc
 1561 ttcggagttg cacagggtcc acggatccag aaacaagccc accagcttgt ggaaccaac
 1621 gtacggctcc tggtttacag agaaaccac caaaaagaat aatcctatag caaagaagga
 1681 gccacacgag aggggtaacc tggggctgga gggaagctgt actgtcccac ctaacgttgc
 1741 aactgggaga ctccggggg cctcactgct cctagagccc tctcgtgta ctgccaatat 40
 1801 gaaggaggta cctctgttca ggctacgtca cttcccttgt gggaatgtca attacggcta
 1861 ccagcaacag ggcttgcct tagaagccgc tactgccct ggagctggc attacgagga
 1921 taccattctg aaaagcaaga atagcatgaa ccagcctggg ccctgagctc ggtcgcacac
 1981 tcacttctct tcctgggat ccctaagacc gtgg

【表 1 - 2 2】

EML4-ALK 変異体 5a タンパク質配列 (BAG75148.1; GI:209837706)

1 mdgfagslidd sisaastsdv qdrlsalesr vqqqedeitv lkaaladvlr raisedhva
61 svkksvsskv yrrkhqelqa mqmelqspey klsklrtsti mtdynpnycf agktsisdl
121 kevprknitl irglghgafg evyegqvsgm pndpsplqva vktlpevcse qdeldfimea
181 liiskfnhq n ivrcigvslq slprfillel maggdllksfl retrprpsqp sslamldllh
241 vardiacgcq yleenhfih diaarncllt cpgpgrvaki gdfgmardiy rasyyrkggc
301 amlpvkwmp eafmegifts ktdtwsfgvl lweifslgym pypsksnqev lefvtsggm
361 dppkncpgpv yrimtqcwqh qpedrpnfai ilerieyctq dpdvintalp ieygplvee
421 ekvpvrpkdp egvppllvsq qakreeersp aappplppts sgkaakkpta aevsvrvprg
481 pavegghvnm afsqsnppse lhrvhgsrnk ptslwnptyg swftekptkk nnpiakeph
541 ergnlglegs ctvppnvatg rlpgasllle pssltanmke vplfrlrhfp cgnvnygyqq
601 qglpleaata pgaghyedti lksknsnmqp gp

【表 1 - 2 3】

EML4-ALK 変異体 5b タンパク質配列 (AB374365.1; GI:209837707)

1 actctgtcgg tccgctgaat gaagtgcccg ccctctaag cccggagccc ggcgctttcc
 61 ccgcaagatg gacggtttcg ccggcagtct cgatgatagt atttctgctg caagtacttc
 121 tgatgttcaa gatcgctgt cagctcttga gtcacgagtt cagcaacaag aagatgaaat
 181 cactgtgcta aaggcggctt tggctgatgt tttgaggcgt ctgcaatct ctgaagatca
 241 tgtggcctca gtgaaaaaat cagtctcaag taaagggtca gagctcaggg gaggatattg
 301 agatccaggg aggcttctg taggaagtgg cctgtgtagt gcttcaaggg ccaggctgcc 10
 361 aggccatgtt gcagctgacc acccactgc agtgtaccgc cggaagcacc aggagctgca
 421 agccatgcag atggagctgc agagccctga gtacaagctg agcaagctcc gcacctgcag
 481 catcatgacc gactacaacc ccaactactg ctttgctggc aagacctct ccatcagtga
 541 cctgaaggag gtgccgcca aaaacatcac cctcattcgg ggtctgggcc atggagcctt
 601 tggggaggtg tatgaaggcc aggtgtccgg aatgcccaac gaccaagcc cctgcaagt
 661 ggctgtgaag acgctgctg aagtgtgctc tgaacaggac gaactggatt tcctcatgga
 721 agccctgatc atcagcaaat tcaaccacca gaacattgtt cgctgcattg gggtagcct
 781 gcaatccctg ccccggttca tctgctgga gctcatggcg gggggagacc tcaagctct 20
 841 cctccgagag acccgccctc gcccgagcca gccctctcc ctggccatgc tggaccttct
 901 gcagtggtc cgggacattg cctgtggctg tcagtattg gaggaaaacc acttcatcca
 961 ccgagacatt gctgccagaa actgcctctt gacctgtcca ggcctggaa gagtggccaa
 1021 gattggagac ttgggatgg cccgagacat ctacagggcg agctactata gaaagggagg
 1081 ctgtgcatg ctgccagta agtggatgcc ccagaggcc tcatggaag gaatattcac
 1141 ttctaaaaca gacacatggt ctttggagt gctgctatgg gaaatcttt ctctggata
 1201 tatgccatac cccagcaaaa gcaaccagga agttctggag tttgtacca gtggaggccg
 1261 gatggacca cccaagaact gccctgggcc tgtataccgg ataatgactc agtctggca 30
 1321 acatcagcct gaagacaggc ccaacttgc catcatttg gagaggattg aatactgcac
 1381 ccaggaccgg gatgtaatca acaccgctt gccgatagaa tatggtccac ttgtggaaga
 1441 ggaagagaaa gtgcctgtga ggccaagga cctgagggg gttctctc tctggtctc
 1501 tcaacaggca aaacgggagg aggagcgag cccagctgcc ccaccacctc tgctaccac
 1561 ctctctggc aaggctgcaa agaaaccac agctgcagag gtctctgtc gactcctag
 1621 agggccggcc gtggaagggg gacacgtgaa tatggcattc tctcagcca accctctc
 1681 ggagttcac aggtccacg gatccagaaa caagcccacc agctgtgga acccaacgta
 1741 cggtctctg ttacagaga aaccaccaa aaagaataat cctatagcaa agaaggagcc 40
 1801 acacgagagg ggtaacctg ggctggaggg aagctgtact gtcccaccta acgttgaac
 1861 tgggagactt cggggggcct cactgctct agagccctct tcgctgactg ccaatatgaa
 1921 ggaggtacct ctgttcaggc tacgtcactt ccttgtggg aatgtcaatt acggctacca
 1981 gcaacagggc ttgccctag aagccgctac tgccctgga gctggtcatt acgaggatac
 2041 cattctgaaa agcaagaata gcatgaacca gcctgggccc tgagctcggc cgcacactca
 2101 cttctctcc ttgggatccc taagaccgtg g

【表 1 - 2 4】

EML4-ALK 変異体 5b タンパク質配列 (BAG75149.1; GI:209837708)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrlsalesr vqqqedeitv lkaaladvlr raisedhva
 61 svkksvsskg selrggygdp grlpvgsglc sasrarlpgh vaadhppavy rrkhqelqam
 121 qmelqspeyk lsklrtstim tdynpnycfa gktssisdik evprknitli rglghgafge
 181 vyegqvsgmp ndpsplqvav ktlpevcseq deldflmeal iiskfnhqni vrcigvslqs
 241 lprfillelm aggdlsftr etrprpsqps slamldllhv ardiacgcqy leenhfihrd
 301 iaarnclltc pggprvakig dfgmardiy asyyrkggca mlpvkwmppe afmegiftsk
 361 tdtwsfgvll weifslgymyp ypsksnqevl efvtsggrmd ppknpcgpyv rimtqcwqhq
 421 pedrpnfaii lerieyctqd pdvintalpi eygplveeee kvpvrpkdpe gvppllvsqq
 481 akreeerspa appplpttss gkaakkptaa evsvrvprgp avegghvnma fsqsnppsel
 541 hrvhgsrnkp tslwnptygs wftekptkkn npiakkephe rgnlglegsc tvppnvatgr
 601 lpgaslllep ssltanmkev plfrlrhfpc gnvnygyqqq glpleaatap gaghyedtil
 661 ksknsmnqpg p

【表 1 - 2 5】

EML4-ALK 変異体 6 核酸配列(AB462411.1; GI:227452648)

1 tactctgtcg gtccgctgaa tgaagtgcc gccctctaa gcccgagcc cggcgcttc
 61 cccgaagat ggacggcttc gccgcagtc tcgatgatag tattctgct gcaagtact
 121 ctgatgtca agatcgctg tcagctctg agtcacgagt tcagcaaca gaagatgaa
 181 tcaactgtct aaaggcgct ttggctgat tttgaggcg tctgcaatc tctgaagatc
 241 atgtggcctc agtgaaaaa tcagtctcaa gtaaaggcca accaagcct cgagcagta
 301 ttccatgct ctgtataacc aatggaagt gtgcaaacag aaaaccaagt catacagtg
 361 ctgtctcaat tgcaggaaaa gaaactctt catctgctgc taaaagtgt acagaaaaa
 421 agaaagaaa accacaagga cagagagaaa aaaagagga atctcattct aatgatcaa
 481 gtccacaaat tcgagcatca cttctcccc agccctctc acaacctctc caaatacaca
 541 gacaaactcc agaaagcaag aatgctact ccaccaaaag cataaaacga ccatcaccag
 601 ctgaaaagtc acataattct tgggaaaatt cagatgatag ccgtaataaa ttgtcga
 661 tacctcaac acccaaatta ataccaaaag ttaccaaaac tgcagacaag cataaagatg
 721 tcatcatcaa ccaagaagga gaatatatta aatgtttat gcgcggtcgg ccaattacca
 781 tgttcattcc ttccgatgtt gacaactatg atgacatcag aacggaactg cctcctgaga
 841 agtcaaact ggagtgggca tatggtatc gaggaagga ctgtagagct aatgtttacc
 901 ttctccgac cggggaata gtttattca ttgcatcagt agtagtacta ttaattatg
 961 aggagagaac tcagcgacac tacctgggcc atacagactg tgtgaaatgc cttgctatac
 1021 atcctgaca aattaggatt gcaactggac agatagctgg cgtggataaa gatggaaggg
 1081 ctctacaacc ccacgtcaga gtgtgggatt ctgtactct atccacactg cagattattg
 1141 gacttggcac tttgagcgt ggagtaggat gcttgattt tcaaaagca gattcaggtg
 1201 tcatttatg tgtattgat gactccaatg agcatatgct tactgtatgg gactggcaga
 1261 ggaaagcaaa aggagcagaa ataaagacaa caaatgaagt tgtttggct gtggagttc
 1321 acccaacaga tgcaaatacc ataattacat gcggtaaatc tcatatttc ttctggacct
 1381 ggagcggcaa ttactaaca agaaaacagg gaattttgg gaaatatgaa aagccaaaat
 1441 ttgtgcagt ttagcattc ttggggaatg gagatgttct tactggagac tcaggtggag
 1501 tcatgcttat atggagcaaa actactgtag agcccacacc tgggaaagga cctaaaggaa
 1561 gtggcctgt tagtgctca agggccaggc tgccaggcca tgttcagct gaccaccac
 1621 ctgcagtga ccgccgaag caccaggagc tgcaagccat gcagatggag ctgcagagcc
 1681 ctgagtaca gctgagcaag ctccgacct cgaccatcat gaccgactac aacccaact
 1741 actgcttgc tggcaagacc tctccatca gtgacctgaa ggaggtgccg cggaaaaaca
 1801 taccctcat tcgggtctg ggcatggag ctttgggga ggtgtatgaa ggccaggtg
 1861 ccggaatgcc caacgacca agccccctgc aagtggctgt gaagacgtg cctgaagtgt
 1921 gctctgaaca ggacgaactg gatttctca tggagcct gatcatcagc aaattcaac
 1981 accagaacat tttcgctgc attgggtga gctgcaatc cctgccccg tcatcctgc
 2041 tggagctcat ggccggggga gacctcaagt cttctccg agagaccgc cctgccccga
 2101 gccagcctc ctccctggcc atgctggacc ttctgcagct ggctcgggac attgctgtg

【表 1 - 2 6】

2161 gctgtcagta ttggaggaa aaccacttca tccaccgaga cattgctgcc agaaactgcc
 2221 tcttgacctg tccaggccct ggaagagtgg ccaagattgg agacttcggg atggcccggag
 2281 acatctacag ggcgagctac tatagaaagg gaggctgtgc catgctgcca gttaagtgga
 2341 tgccccaga ggccttcctg gaaggaatat tcacttctaa aacagacaca tggctccttg
 2401 gagtgctgct atgggaaatc ttttctctg gatatatgcc ataccaccagc aaaagcaacc
 2461 aggaagtctt ggagtttgc accagtggag gccggatgga cccaccaag aactgccctg
 2521 ggctgtata ccgataatg actcagtctt ggcaacatca gcctgaagac aggcccaact 10
 2581 ttgccatcat ttggagagg attgaatact gcaccagga cccggatgta atcaacaccg
 2641 cttgccgat agaatatggt ccactgtgg aagaggaaga gaaagtgcct gtgaggcca
 2701 aggacctga gggggttct cctctctgg tctctcaaca ggcaaacgg gaggaggagc
 2761 gcagcccagc tgccccacca cctctgcta ccactctc tggcaaggct gcaaagaac
 2821 ccacagctgc agaggtctct gttcagctc ctagaggcc gccctggaa gggggacacg
 2881 tgaatatggc attctctcag tccaaccctc cttcggagt gcacagggtc cacggatcca
 2941 gaaacaagcc caccagcttg tggaaccaa cgtacggctc ctggttaca gagaaacca
 3001 caaaaagaa taatcctata gaaagaagg agccacacga gaggggtaac ctggggctgg 20
 3061 agggaagctg tactgtcca ctaacgttg caactgggag acttccgggg gcctcactgc
 3121 tctagagcc ctctcgctg actgccaata tgaaggagt acctctgtc aggctacgtc
 3181 acttccttg tgggaatgc aattacggct accagcaaca gggctgccc ttagaagccg
 3241 ctactgccc tggagctggt cattacgagg ataccattct gaaaagcaag aatagcatga
 3301 accagcctgg gccctgagct cggctgcaca ctactctc ttcttgga tcctaagac
 3361 cgtgg

【表 1 - 2 7】

EML4-ALK 変異体 6 タンパク質配列 (BAH57335.1; GI:227452649)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrsalesr vqqgedeitv lkaaladvlr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavv iagketlssa aksgtekkke
 121 kpggqrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknaptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tpklipkvtk tadkhkdvii ngegeyikmf mrgrpitmfi
 241 psdvdyddi rtelpeklk lewaygyrgk dcranvylp tgeivyfias vvvlfnyeer
 301 tqrhylghtd cvkclaihpq kiriatgqia gvdkdgrplq phvrwdsvt lslqiigl 10
 361 tfergygld fskadsgvhl cviddsnehm ltvwdwqrka kgaeiktne vvlavefhpt
 421 dantiitcgk shiffwtwsg nsltrkqgif gkyekpkfvq clafngndv ltgdsggvml
 481 iwskttept pgkgpkgsq csasarlpq hvaadhppav yrrkhqelqa mqmelqspey
 541 klsklrtsti mtdynpnycf agktssidl kevprknitl irglghgafg evyegqvsgm
 601 pndpsplqva vktlpevcse qdeldflmea liiskfnhqn ivrcigvslq slprfillel
 661 maggdksfl retrprpsqp sslamldllh vardiacgcq yleenhfih diaarnclt
 721 cpgpgrvaki gdfgmardiy rasyyrkggc amlpvkwmp eafmegifts ktdtwsfgvl
 781 lweifslgym pypsksnqev lefvtsggm dppkncpgpv yrimtqcwqh qpedrpnfai 20
 841 ilerieyctq dpdvintalp ieygplveee ekvprpkdp egvppllvsq qakreeersp
 901 aappplppts sgkaakkpta aevsvrvprg pavegghvnm afsqsnppse lhrvhgsrnk
 961 ptslwnptyg swftekptkk nnpiakeph ergnllegs ctvppnvatg rlpgasllle
 1021 pssltnmke vplfrlrhfp cgnvnygyqq qglpleaata pgaghyedti lksknsnqp
 1081 gp

【表 1 - 2 8】

EML4-ALK 変異体 7 核酸配列 (AB462412.1; GI:227452650)

1 tactctgtcg gtccgctgaa tgaagtgcc gccctctaa gcccgagcc cggcgcttc
 61 cccgcaagat ggacggttc gccggcagtc tcgatgatag tattctgtct gcaagtactt
 121 ctgatgttca agatcgctg tcagctctg agtcacgagt tcagcaaca gaagatgaaa
 181 tcaactgtct aaaggcggct ttggctgatg tttgaggcg tcttgaatc tctgaagatc
 241 atgtggcctc agtgaaaaa tcagtctcaa gtaaaggcca accaagcct cgagcagtta
 301 ttccatgtc ctgtataacc aatggaagt gtgcaaacag aaaaccaagt cataccagtg 10
 361 ctgtctcaat tgcaagaaa gaaactctt catctgtctg taaaagtgt acagaaaaa
 421 agaaagaaa accacaagga cagagagaaa aaaagagga atctcattct aatgatcaaa
 481 gtccacaaat tcgagcatca ctttctccc agcctcttc acaactctc caaatacaca
 541 gacaaactcc agaaagcaag aatgtactc ccacaaaag cataaaacga ccatcaccag
 601 ctgaaaagtc acataattct tgggaaaatt cagatgatag ccgtaataaa ttgtcgaana
 661 taccttaac acccaatta atacaaaag ttacaaaac tgcaagcaag cataaagatg
 721 tcacatcaa ccaagaagga gaatatatta aatgtttat gcgcggtcgg ccaattacca
 781 tgttcattcc ttccgatgt gacaactatg atgacatcag aacggaactg cctcctgaga 20
 841 agtcaaaact ggagtgggca tatggtatc gaggaagga ctgtagagct aatgtttacc
 901 ttctccgac cggggaata gtttattca tgcacatcag agtagtacta ttaattatg
 961 aggagagaac tcagcgacac tacctgggcc atacagactg tgtgaaatgc cttgctatac
 1021 atcctgacaa aataggatt gcaactggac agatagctgg cgtggataaa gatggaaggc
 1081 ctctacaacc ccacgtcaga gtgtgggatt ctgtactct atccactg cagattattg
 1141 gacttggcac tttgagcgt ggagtaggat gcctggatt tcaaaagca gattcaggtg
 1201 tcatttatg tgtattgat gactccaatg agcatatgct tactgtatgg gactggcaga
 1261 ggaaagcaaa aggagcagaa ataaagacaa caaatgaagt tgtttggct gtggagttc 30
 1321 acccaacaga tgcaaatacc ataattacat gcggtaaatc tcatatttc ttctggacct
 1381 ggagcggcaa ttactaaca agaaaacagg gaattttgg gaaatagaa aagccaaaat
 1441 ttgtcagtg ttagcattc ttggggaatg gagatgttct tactggagac tcaggtggag
 1501 tcatgcttat atggagcaaa actactgtag agcccacacc tgggaaagga ctaaagggtg
 1561 tatacaaat cagcaacaa atcaaagctc atgatggcag tgtgtcaca cttgtcaga
 1621 tgagaaatgg gatgtatta actggaggag ggaaagacag aaaaataatt ctgtgggatc
 1681 atgatctgaa tcctgaaaga gaaatagagc accaggagct gcaagccatg cagatggagc
 1741 tgcaagccc tgagtacaag ctgagcaagc tccgcacct gaccatcatg accgactaca 40
 1801 acccaacta ctgcttgct ggcaagacct cctcatcag tgacctgaag gagtgccgc
 1861 ggaaaaacat caccctcatt cgggtctgg gccatggagc ctttggggag gtgtatgaag
 1921 gccaggtgtc cggaatgcc aacgaccaa gcccctgca agtggtgtg aagacgtgc
 1981 ctgaagtgt ctctgaacag gacgaactgg atttctcat ggaagcctg atcatcagca
 2041 aattcaacca ccagaacatt gttcgtgca ttgggtgag cctgcaatcc ctgccccgt
 2101 tcatcctgct ggagctcatg gcggggggag acctcaagtc cttcctccga gagaccgccc

【表 1 - 2 9】

2161 ctcgcccagag ccagccctcc tccttgcca tgctggacct tctgcacgtg gctcgggaca
 2221 ttgctgtgg ctgtcagat ttggaggaaa accacttcat ccaccgagac attgctgcca
 2281 gaaactgct cttgacctgt ccaggccctg gaagagtggc caagattgga gacttcggga
 2341 tggcccgaga catctacagg gcgagctact atagaaaggg aggctgtgcc atgctgccag
 2401 ttaagtggat gccccagag gccttcatgg aaggaatatt cacttctaaa acagacacat
 2461 ggtcctttgg agtgctgcta tgggaaatct tttctctgg atatatgcca taccacgca
 2521 aaagcaacca ggaagttctg gagttgtca ccagtggagg ccgatggac ccaccaaga 10
 2581 actgccctgg gctgtatac cggataatga ctcagtgtg gcaacatcag cctgaagaca
 2641 ggccaactt tgccatcatt ttggagagga ttgaatactg caccaggac ccgatgtaa
 2701 tcaacaccgc ttgcccata gaatatggtc cacttggtga agaggaagag aaagtgcctg
 2761 tgaggcccaa ggaccctgag ggggttctc ctctcctgt ctctcaacag gcaaaacggg
 2821 aggaggagcg cagcccagct gcccaccac ctctgcctac cacctctct ggcaaggctg
 2881 caaagaaacc cacagctgca gaggtctctg ttcgagtccc tagagggccg gccgtggaag
 2941 ggggacacgt gaatatggca ttctctcagt ccaaccctcc ttcggagttg cacaaggtcc
 3001 acgatccag aaacaagccc accagcttgt ggaaccaac gtacggctcc tggtttacag 20
 3061 agaaaccac caaaaagaat aatctatag caaagaagga gccacacgac aggggtaacc
 3121 tggggctgga gggaagctgt actgtcccac ctaacgttg aactgggaga ctccggggg
 3181 cctcactgct ctagagccc tcttcgctga ctgccaatat gaaggagga cctctgtca
 3241 ggctacgtca ctcccttgt gggaatgtca attacggcta ccagcaacag ggcttgcct
 3301 tagaagccgc tactgccct ggagctggtc attacgagga taccattctg aaaagcaaga
 3361 atagcatgaa ccagcctggg ccctgagctc ggtcgcacac tcaattctct tcctgggat
 3421 ccctaagacc gtgga

【表 1 - 3 0】

EML4-ALK 変異体 7 タンパク質配列 (BAH57336.1; GI:227452651)

1 mdgfagsldd sisaastsdv qdrisalesr vqqqedeitv lkaaladvlr rlaisedhva
 61 svkksvsskg qpspravipm scitngsgan rkpshtsavs iagketlssa aksgtekke
 121 kpggqrekke eshsndqspq iraspspqs sqplqihrt pesknatptk sikrpspaek
 181 shnswensdd srnklskips tklipkvtk tadhkdvii nqegeyikmf mrgrpitmfi
 241 psdvdnyddi rtelpeklk lewaygyrgk dcranvylp tgeivyfias vvlfnyeer
 301 tqrhylghtd cvkclaihpd kiriatgqia gvdkdgrplq phvrwdsvt lstliiglg 10
 361 tfergvglcd fskadsgvhl cviddsnehm ltwdwqrka kgaeiktne vvlavefhpt
 421 dantiitcgk shiffwtwsg nsltrkqgif gkyekpkfvq claflngdv ltgdsggvml
 481 iwskttept pgkgpkgvyq iskqikahdg svftlcqmrn gmltgggkd rkiiwdhdl
 541 npereiehqe lqamqmelqs peyklsklrt stimtdynpn ycfagktssi sdlkevprkn
 601 itlirglghg afgevyegqv sgmpndpspl qvavktlpev cseqdeldfl mealiiskfn
 661 hqnivrcigv slqslprfil lelmaggdlk sflretrprp sqpsslamld llhvardiac
 721 gcqyleenhf ihrdiaarnc lltcpggprv akigdfgmar diyrasyyrk ggcamlpvkw
 781 mppeafmegi ftsktdtwsf gvllweifsl gympypsksn qevlefvtsq grmdppkncp 20
 841 gpvyrimtqc wqhqpedrpn faileriey ctqdpdvint alpieygplv eeeekvprp
 901 kdpegvppll vsqqakreee rspaappplp ttssgkaakk ptaaevsvrv prgpaveggh
 961 vnmafsqsnp pselhkvhgs rnkptslwnp tygswftekp tkknnpiakk ephdrgnlgl
 1021 egscvppnv atgrlpgasl llepsslitan mkevplflrl hfpcgnvnynq yqqqglplea
 1081 atapgaghye dtilksksnm nqpgp

【表 1 - 3 1】

KIF5B-ALK 核酸配列 (AB462413.1; GI:227452652)

1 tgcgagaaag atggcggacc tggccgagtg caacatcaaa gtgatgtgtc gcttcagacc
 61 tctcaacgag tctgaagtga accgcggcga caagtacatc gccaaagttc agggagaaga
 121 cacggctgtg atcgcgtcca agccttatgc attgatcgg gtgtccagt caagcacatc
 181 tcaagagcaa gtgtataatg actgtgcaaa gaagattggt aaagatgtac ttgaaggata
 241 taatggaaca atatttgc atggacaaac atcctctggg aagacacaca caatggaggg
 301 taaacttcat gatccagaag gcatgggaat tattccaaga atagtgaag atattttaa 10
 361 ttatatttac tccatggatg aaaatttga atttcatatt aaggtttcat attttgaat
 421 atatttggat aagataaggg acctgttaga tgtttcaaag accaaccttt cagttcatga
 481 agacaaaaac cgagttccct atgtaaaggg gtgcacagag cgttttgtat gtatccaga
 541 tgaagttatg gataccatag atgaaggaaa atccaacaga catgtagcag ttacaaatat
 601 gaatgaacat agctctagga gtcacagtat atttcttatt aatgtcaaac aagagaacac
 661 acaaacggaa caaaagctga gtggaaaact ttatctgggt gatttagctg gtatgaaaa
 721 ggtagtaaa actggagctg aagggtctgt gctggatgaa gctaaaaaca tcaacaagtc
 781 actttctgct cttggaaatg ttatttctgc tttggctgag ggtagtacet atgttccata 20
 841 tcgagatagt aaaatgacaa gaatcctca agattcatta ggtggcaact gtagaaccac
 901 tattgtaatt tgctgcttc catcatcata caatgagtct gaaacaaaat ctacactct
 961 atttggccaa agggccaaaa caattaagaa cacagtttgt gtcaatgtgg agttaactgc
 1021 agaacagtgg aaaaagaagt atgaaaaaga aaaagaaaaa aataagatcc tgccgaacac
 1081 tattcagtgg cttgaaaatg agctcaacag atggcgtaat ggggagacgg tgctattga
 1141 tgaacagttt gacaaagaga aagccaactt ggaagctttc acagtggata aagatattac
 1201 tcttaccat gataaaccag caaccgcaat tggagttata gaaaatttta ctgatgctga
 1261 aagaagaaag tgtgaagaag aaattgctaa attatacaaa cagcttgatg acaaggatga 30
 1321 agaaattaac cagcaaagtc aactggtaga gaaactgaag acgcaaagt tggatcagga
 1381 ggagctttg gcatctacca gaagggatca agacaatatg caagctgagc tgaatcgct
 1441 tcaagcagaa aatgatgctc ctaaagaaga agtgaaagaa gttttacagg ccctagaaga
 1501 acttgctgtc aattatgatc agaagtctca ggaagttgaa gacaaaacta agaatatga
 1561 attgcttagt gatgaattga atcagaaatc ggcaacttta gcgagtatag atgctgagct
 1621 tcagaaactt aaggaaatga ccaaccacca gaaaaaacga gcagctgaga tgatggcatc
 1681 ttactaaaa gaccttgacg aataggaat tgctgtggga aataatgatg taaagcagcc
 1741 tgagggaaact ggcatgatag atgaagagtt cactgttgca agactctaca ttagcaaaat 40
 1801 gaagtcagaa gtaaaaacca tgggtgaaacg ttgcaagcag ttagaaagca cacaaactga
 1861 gagcaacaaa aaaatggaag aaaatgaaaa ggagttagca gcatgtcagc ttcgtatctc
 1921 tcaacatgaa gccaaaatca agtcattgac tgaatacctt caaatgtgg aacaaaagaa
 1981 aagacagttg gaggaatctg tcgatgccct cagtgaagaa ctagtccagc ttcgagcaca
 2041 agagaaagtc catgaaatgg aaaaggagca cttaaataag gttcagactg caaatgaagt
 2101 taagcaagct gttgaacagc agatccagag ccatagagaa actcatcaaa aacagatcag
 2161 tagtttgaga gatgaagtag aagcaaaagc aaaacttatt actgatctc aagacaaaa

【表 1 - 3 2】

2221 ccagaaaatg atgtagagc aggaacgtct aagagtagaa catgagaagt tgaagccac
 2281 agatcaggaa aagagcagaa aactacatga acttacgggt atgcaagata gacgagaaca
 2341 agcaagacaa gacttgaagg gtttgaaga gacagtggca aaagaacttc agactttaca
 2401 caacctgcbc aaactcttg ttcaggacct ggctacaaga gttaaaaaga gtgctgagat
 2461 tgattctgat gacaccggag gcagcgctgc tcagaagcaa aaaatctctt ttctgaaaa
 2521 taatcttgaa cagctacta aagtgcacaa acagttgta cgtgataatg cagatctccg
 2581 ctgtgaactt cctaagttgg aaaagcgact tcgagctaca gctgagagag tgaagcttt 10
 2641 ggaatcagca ctgaaagaag ctaaagaaaa tgcatctcgt gatcgcaaac gctatcagca
 2701 agaagtagat cgcataaagg aagcagtcag gtcaaagaat atggccagaa gagggcattc
 2761 tgacagatt gtgtaccgcc ggaagcacca ggagctgcaa gccatgcaga tggagctgca
 2821 gagccctgag tacaagctga gcaagctccg cacctcgacc atcatgaccg actacaacct
 2881 caactactgc ttgtctgca agacctctc catcagtgac ctgaaggagg tgccgcgaa
 2941 aaacatcacc ctattcggg gtctgggcca tggcgcttt ggggaggtgt atgaaggcca
 3001 ggtgtccgga atgccaacg acccaagccc cctgcaagtg gctgtgaaga cgctgcctga
 3061 agtgtgctct gaacaggacg aactggattt cctcatggaa gcctgatca tcagcaaatt 20
 3121 caaccaccag aacattgttc gctgcattgg ggtgagcctg caatccctgc cccggttcat
 3181 cctgctggag ctatggcgg ggggagacct caagtcctc ctccgagaga cccgcccctg
 3241 cccgagccag cctcctccc tggccatgct ggacctctg cacgtggctc gggacattgc
 3301 ctgtggctgt cagtatttg aggaaaacca ctcatccac cgagacattg ctgccagaaa
 3361 ctgcctctg acctgtccag gcctggaag agtggccaag attggagact tcgggatggc
 3421 ccgagacatc tacagggcga gctactatag aaagggaggc tgtgcatgc tgccagttaa
 3481 gtggatgcc ccagaggcct tcatggaagg aatattcact tctaaaacag acacatggc
 3541 cttggagtg ctgctatggg aaactcttc tctggatat atgcatacc ccagcaaaag 30
 3601 caaccaggaa gttctggagt ttgtaccag tggaggccgg atggaccac ccaagaactg
 3661 ccctggcct gtataccgga taatgactca gtgctggca catcagcctg aagacaggcc
 3721 caacttgcc atcatttg agaggattga atactgcacc caggaccgg atgtaatcaa
 3781 caccgcttg ccgatagaat atggtccact tgtggaagag gaagagaaag tgctgtgag
 3841 gcccaaggac cctgaggggg ttctctctc cctgtctct caacaggcaa aacgggagga
 3901 ggagcgcagc ccagctgcc caccacctt gctaccacc tccttgga aggctgcaaa
 3961 gaaaccaca gctgcagagg tctctgttc agtcctaga gggccggccg tggaaggggg
 4021 acacgtgaat atggcattct ctcagccaa cctccttcg gagttgcaca aggtccacgg 40
 4081 atccagaaac aagcccacca gctgtggaa cccaacgtac ggctcctggt ttacagagaa
 4141 accaccaaaa aagaataatc ctatagcaaa gaaggagcca cacgacagg gtaacctggg
 4201 gctggaggga agtgtactg tccacctaa cgttgcaact gggagacttc cgggggctc
 4261 actgctcta gagccctct cgctgactgc caatatgaag gaggtacctc tttcaggct
 4321 acgtcactc cctgtggga atgtcaatta cggtaccag caacagggtc tgcccttaga
 4381 agccgctact gccctggag ctggtcatta cgaggatacc attctgaaaa gcaagaatag
 4441 catgaaccag cctgggcct gagctcggtc gcacactca

【表 1 - 3 3】

KIF5B-ALK タンパク質配列 (**BAH57337.1; GI:227452653**)

1 madlaecnik vmcfrplne sevnrgdkiy akfqedtvv iaskpyafdr vfgsstsseq
 61 vyndcakkiv kvdlegyngt ifaygqtssg kthtmegklh dpegmgiiipr ivqdifnyiy
 121 smdenlefhi kvsyfeiyld kirdlldvsk tnlsvhedkn rvpvykgcte rfvcspdevm
 181 dtidegksnr hvavtnmneh ssrshsifli nvkqentqte qklsqklylv dlagsekvsk
 241 tgaegavlde akninkslsa lgnvisalae gstyvpyrds kmtrilqdsi ggnrcrtivi
 301 ccspssynes etkstllfgq raktikntvc vnveltaeqw kkkyekekek nkilrntiqw 10
 361 lenelnrwrn getvpideqf dkekanleaf tvdkditln dkpataigvi gnftdaerrk
 421 ceeeiaklyk qlddkdeein qqsqlevklk tqmldqeell astrrdqdnm qaelnrlqae
 481 ndaskeevke vlqaleelav nydqksqeve dktkeyells delnqksatl asidaelqkl
 541 kemtnhqkkr aaemmasllk dlaeigiavg nndvkqpegt gmideeftva rlyiskmkse
 601 vktmvkrckq lestqtesnk kmeenekela acqlrisqhe akikslteyl qnveqkkrql
 661 eesvdalsee lvqlraqekv hemekehlnk vqtanevkqa veqqiqshre thqkqisslr
 721 deveakakli tdlqdnqkm mleqerlrve heklkatdqe ksrklheltv mqdrreqarq
 781 dlkgleetva kelqtlhnlr klfvqdlatr vkksaeidsd dtggsaaqkq kisflennle 20
 841 qltkvhkqlv rdnadlrcel pklekrlrat aervkalesa lkeakenasr drkryqqevd
 901 rikeavrskn marrghsaqi vyrrkhqelq amqmelqspe yklsklrtst imtdynpnyc
 961 fagktssisd lkevprknit lirlghgaf gevyegqvsg mpndpsplqv avktlpevcs
 1021 eqdeldfime aliiskfnhq nivrcigvsl qslprfille lmaggdllsf lretrprsq
 1081 psslamldll hvardiacgc qyleenhfih rdiaarncll tcpgpgrvak igdfgmardi
 1141 yrasyyrkgg camlpvkwmp peafmegift sktdtwsfgv llweifslgy mpypsksnqe
 1201 vleftvsggr mdppkncpgp vyrimtqcwq hqpedrpnfa iilerieyct qdpdvintal
 1261 pieygpvee eekvprpkd pegvppllvs qqakreeers paappplptt ssgkaakkpt 30
 1321 aaevsvrpr gpavegghvn mafsqsnpps elhkvhgsrn kptslwnpty gswftekptk
 1381 knnpiakkep hdrnglqleg sctvppnvat grlpgaslll epslitanmk evplfirlhf
 1441 pcgnvnygyq qqglpleaat apgaghyedt ilsksnsmnq pgp

NPM-ALK 配列 (t(2;5) (p23;q35) 染色体転座配列) ***TPM3-ALK 配列 (t(1;2) (p25;p23) 染色体転座配列) ***

【表 1 - 3 4】

TFGXL-ALK 核酸配列 (AF390893.1; GI:20269389)

1 atgaacggac agttggatct aagtgggaag ctaatcatca aagctcaact tggggaggat
 61 attcggcgaa ttctattca taatgaagat attacttatg atgaattagt gctaatgatg
 121 caacgagttt tcagaggaaa acttctgagt aatgatgaag taacaataaa gtataaagat
 181 gaagatggag atcttataac aattttggat agttctgacc tttcctttgc aattcagtgc
 241 agtaggatac tgaactgac attatttgtt aatggccagc caagaccctt tgaatcaagt 10
 301 caggtgaaat atctccgtcg agaactgata gaacttcgaa ataaagtga tggtttattg
 361 gatagcttgg aaccacctgg agaaccagga cctccacca atattctga aatgatact
 421 gtggatggtg gggaagaaaa gtctgcttct gattcttctg gaaaacagtc tactcaggtt
 481 atggcagcaa gtatgtctgc ttttgatcct ttaaaaaacc aagatgaaat caataaaaat
 541 gttatgtcag cgtttggctt aacagatgat caggtttcag ggccaccag tgctcctgca
 601 gaagatcgtt caggaacacc cgacagcatt gcttctcct cctcagcagc tcaccacca
 661 ggcgttcagc cacagcagcc accatataca ggagctcaga ctcaagcagg tcagattgaa
 721 gtgtaccgcc ggaagcacca ggagctgcaa gccatgcaga tggagctgca gagcctgag 20
 781 tacaagctga gcaagctcg cacctcgacc atcatgaccg actacaacc caactactgc
 841 tttgctggca agacctcctc catcagtgac ctgaaggagg tgccgaggaa aaacatcacc
 901 ctattcggg gtctgggcca tggcgctt ggagggtgt atgaaggcca ggtgtccgga
 961 atgccaacg acccaagccc cctgcaagtg gctgtgaaga cgctgctga agtgtgctct
 1021 gaacaggacg aactggattt cctcatggaa gccctgatca tcagcaaatt caaccaccag
 1081 aacattgttc gctgcattgg ggtgagcctg caatccctgc cccggttcat cctgctggag
 1141 ctatggcgg ggggagacct caagtcctc ctccgagaga cccgccctcg cccgagccag
 1201 cctcctccc tggcatgct ggaccttctg cacgtggctc gggacattgc ctgtggctgt 30
 1261 cagtatttgg aggaaaacca ctcatccac cgagacattg ctgccagaaa ctgcctctg
 1321 acctgtccag gccctggaag agtggccaag attggagact tcgggatggc ccgagacatc
 1381 tacagggcga gctactatag aaagggaggc tgtgccatgc tgccagtaa gtggatgcc
 1441 ccagaggcct tcatggaagg aatattcact tctaaaacag acacatggtc ctttggagtg
 1501 ctgctatggg aatcttttc tcttgatgat atgccatacc ccagcaaaag caaccaggaa
 1561 gttctggagt ttgtaccag tggaggccgg atggaccac ccaagaactg ccttggcct
 1621 gtataccgga taatgactca gtgctggcaa catcagcctg aagacaggcc caactttgcc
 1681 atcattttgg agaggattga atactgcacc caggaccgg atgtaataa caccgctttg 40
 1741 ccgatagaat atggtccact tgtggaagag gaagagaaag tgctgtgag gcccaaggac
 1801 cctgaggggg ttctcctct cctggtctct caacaggcaa aacgggagga ggagcgcagc
 1861 ccagctgccc caccactct gctaccacc tctctggca aggctgcaaa gaaaccaca
 1921 gctgcagagg tctctgttc agtccctaga gggccggccg tggaaggggg acacgtgaat
 1981 atggcattct ctcagtccaa cctcctcctg gagttgcaca aggtccacgg atccagaaac

【表 1 - 3 5】

2041 aagcccacca gcttgtggaa cccaacgtac ggctcctggt ttacagagaa acccaccaaa
 2101 aagaataatc ctatagcaaa gaaggagcca cagcacaggg gtaacctggg gctggagggg
 2161 agctgtactg tcccacctaa cgltgcaact gggagacttc cgggggcctc actgtccta
 2221 gagccctctt cgctgactgc caatatgaag gaggtacctc tgttcaggct acgtcacttc
 2281 ccttgtggga atgtcaatta cggctaccag caacagggct tgcccttaga agccgctact
 2341 gccctggag ctggtcatta cgaggatacc attctgaaaa gcaagaatag catgaaccag
 2401 cctgggcct ga

10

【表 1 - 3 6】

TFGXL-ALK タンパク質配列 (**AAM17922.1; GI:20269390**)*

1 mngqldlsgk liikaqlged irriphned itydelvlmm qrvfrgklls ndevtikykd
 61 edgdlitifd ssdlfaiqc srilklitfv ngqprpless qvkylrreli elrnkvnrl
 121 dsleppgepg pstnipendt vdgreekas dssgkqstqv maasmsafdp lknqdeinkn
 181 vmsafgltdd qvsgppsapa edrsgtpdsi assssaahpp gvqpqqppyt gaqtqagqie
 241 vyrrkhqelq amqmelqspe yklsklrtst imtdynpnyc fagktssisd lkevprknit
 301 lirglghgaf gevyegqvsg mpndpsplqv avktlpevcs eqdeldflme aliiskfnhq
 361 nivrcigvsl qslprfille lmaggdllsf lretrprsq psslamldll hvardiacgc
 421 qyleenhfih rdiaarncll tcpgpgrvak igdfgmardi yrasyyrkkg camlpvkwmp
 481 peafmegift sktdtwsfgv llweifslgy mpypsksnqe vleftsggr mdppkncpgp
 541 vyrimtqcwq hqpedrpnfa iilerieyct qdpdvintal pieygplvee eekvpvrpkd
 601 pegvppllvs qqakreers paappplptt ssgkaakkpt aaevsvrvpr gpavegghvn
 661 mafsqsnpps elkhvhgsrn kptslwnpty gswftekptk knnpiakkep hdrnglleg
 721 sctvppnvat grlpgaslll epssltnmk evplfrlrhf pcgnvnygyq qqgpleaat
 781 apgaghyedt ilksknsnmq pggp

20

30

【表 1 - 3 7】

TFGL-ALK 核酸配列 (AF143407.1; GI:6739534)

1 cctccgcaag ccgtctttct ctgagttgt atatatagaa catcctggag tccacatga
 61 acggacagtt ggatctaagt gggaagctaa tcatcaaagc tcaactggg gaggatattc
 121 ggccaattcc tattcataat gaagatatta cttatgatga attagtgcta atgatgcaac
 181 gagtttcag aggaaaactt ctgagtaatg atgaagtaac aataaagtat aaagatgaag
 241 atggagatct tataacaatt tttgatagtt ctgaccttc cttgcaatt cagtgcaag
 301 ggatactgaa actgacatta tttgtaatg gccagccaag acccctgaa tcaagtcagg 10
 361 tgaatatct ccgtcgagaa ctgatagaac ttcgaaataa agtgaatcgt ttattggata
 421 gcttgaacc acctggagaa ccaggacctt ccaccaatat tctgaaaat gatactgtgg
 481 atggtagga agaaaagtct gcttctgatt cttctggaaa acagtctact caggttatgg
 541 cagcaagtat gtctgctttt gatcctttaa aaaaccaaga tgaatcaat aaaaatgta
 601 tgtcagcgtt tggcttaaca gatgatcagg ttcagtgtc cgcgggaag caccaggagc
 661 tgcaagccat gcagatggag ctgcagagcc ctgagtacaa gctgagcaag ctccgacct
 721 cgaccatcat gaccgactac aacccaact actgcttgc tggcaagacc tcctcatca
 781 gtgacctgaa ggaggtgccg cggaaaaaca tcacctcat tcgggtctg ggccatggcg 20
 841 ctttgggga ggtgatgaa ggccaggtgt ccggaatgcc caacgacca agccccctgc
 901 aagtggctgt gaagacgctg cctgaagtgt gctctgaaca ggacgaactg gatttctca
 961 tggaaacct gatcatcagc aaattcaacc accagaacat tttcgtctg attgggtga
 1021 gctgcaatc cctgccccg ttatcctgc tggagctcat ggcgggggga gacctcaagt
 1081 ctttctccg agagaccgc cctgcccga gccagccctc ctccctggcc atgctggacc
 1141 ttctcacgt ggctgggac attgctgtg gctgtcagta tttggaggaa aaccattca
 1201 tccaccgaga cattgtgcc agaaactgcc tctgacctg tccaggccct ggaagatgg
 1261 ccaagattgg agactcggg atggccgag acatctacag ggcgagctac tatagaaagg 30
 1321 gaggctgtc catgctgca gtaagtga tgccccaga ggcctcatg gaaggaat
 1381 tcattctaa aacagacaca tggctcttg gagtctgct atgggaaatc ttttcttg
 1441 gatatatgcc ataccagc aaaagcaacc aggaagtct ggagttgtc accagtggag
 1501 gccgatgga cccaccaag aactgccctg ggctgtata ccggataatg actcagtgt
 1561 ggcaacatca gctgaagac aggcccaact tgccatcat tttggagagg attgaatac
 1621 gcaccagga cccgatgta atcaacacc cttgccgat agaatatgt cactgtgg
 1681 aagaggaaga gaaagtgcct gtgaggcca aggacctga ggggttct cctctctgg
 1741 tcttcaaca ggcaaacgg gaggaggagc gcagcccagc tgccccacca cctctgcta 40
 1801 ccactctc tggcaaggct gaaagaaac ccacagctc agaggtctc gttcagatc
 1861 ctgagggcc ggccgtgaa gggggacacg tgaatatggc attctctcag tccaacctc
 1921 cttcgaggt gcacaaggc cacgatcca gaaacaagc caccagctg tgaaccaa
 1981 cgtacggct ctggttaca gagaacca caaaaagaa taatctata gcaagaagg

【表 1 - 3 8】

2041 agccacacga caggggtaac ctggggctgg agggaagctg tactgtccca cctaacgttg
 2101 caactgggag acttccgggg gcctcactgc tcctagagcc ctcttcgctg actgccaata
 2161 tgaaggaggt acctctgttc aggctacgtc acttcccttg tgggaatgtc aattacggct
 2221 accagcaaca gggcttgccc ttagaagccg ctactgcccc tggagctggt cattacgagg
 2281 ataccattct gaaaagcaag aatagcatga accagcctgg gccctgagct cggtcgcaca
 2341 ctacttctc ttcttgggga tcctaagac cgtggaggag agagaggcaa tggctccttc
 2401 acaaaccaga gaccaaagt caggtttgt tttgtgcaa cctatttga agtaccacca
 2461 aaaaagctgt atttgaaaa tgcttagaa aggtttgag catgggttca tcctattct
 2521 tcgaaagaag aaaatatcat aaaaatgagt gataaataca aggccagat gtggttgc
 2581 aaggtttta tgcattgtt ttgtatact cctatgctt ctttaaatt gtgtgtgct
 2641 tgcttcaatg tagtcagaat tagctgctc tatgttcat agttggggtc atagatggt
 2701 cctgccttg ttgatgtga catgagccat ttgaggggag agggaacgga aataaggag
 2761 ttattgtaa tgactaaa

10

【表 1 - 3 9】

TFGL-ALK タンパク質配列 (AAF27292.1; GI:6739535)*

20

1 mngqldlsgk liikaqlged irriphned itydelvlmm qrvfrgklls ndevtikykd
 61 edgdlitfd ssdlsfaiqc srilkltfv ngqprpless qvkylrreli elrnkvnrl
 121 dsleppgepg pstnipendt vdgreeksas dssgkqstqv maasmsafdp lknqdeinkn
 181 vmsafgltd qvsyrrkhq elqamqmelq speyklsklr tstimtdynp nycfagktss
 241 isdlkevprk nitlirglgh gafgevyegq vsgmpndpsp lqvavktlpe vcseqdeldf
 301 lmealiiskf nhqnivrcig vslqslprfi llelmaggdl ksflretrpr psqpsslaml
 361 dllhvardia gcqyleenh fihrdiaarn cltccpgpgr vakigdfgma rdiyrasyyr
 421 kggcamlpvk wmppeafmeg iftsktdtws fgvllweifs lgympypskns nqevlefvs
 481 ggrmdppknc pgpvrimtq cwqhapedrp nfaiilerie yctqdpdvin talpieygpl
 541 veeeekvpr pkdpegvppl lvsqqakree erspaapppl pttssgkaak kptaaevsvr
 601 vprgpavegg hvnmafsqsn ppselhkvhg srnkptslwn ptygswftek ptkknnpiak
 661 kephdrnglg legscvppn vatgrlpgas llepsslta nmkevplfrl rhfpcgnvny
 721 gyqqqgple aatapgaghy edtilkskns mnqpgp

30

【表 1 - 4 0】

TFGS-ALK 核酸配列 (AF125093.1; GI:7229260)

1 cctccgcaag ccgcttttct ctgagttgt atatatagaa catcctggag tccaccatga
 61 acggacagtt ggatctaagt ggggaagctaa tcatcaaac tcaacttggg gaggatattc
 121 ggcaattcc tattcataat gaagatatta cttatgatga attagtgcta atgatgcaac
 181 gagttttcag aggaaaactt ctgagtaatg atgaagtaac aataaagtat aaagatgaag
 241 atggagatct tataacaatt tttgatagtt ctgaccttc ctttgcaatt cagtgcaagta
 301 ggatactgaa actgacatta tttgtaatg gccagccaag acccctttaa tcaagtcagg 10
 361 tgaatatct ccgtcgagaa ctgatagaac ttcgaaataa agtgaatcgt ttattggata
 421 gcttggacc acctggagaa ccaggacctt ccaccaatat tctgaaaat gtgtaccgcc
 481 ggaagacca ggagctgcaa gccatgcaga tggagctgca gagccctgag tacaagctga
 541 gcaagctccg cacctcgacc atcatgaccg actacaacc caactactgc tttgctggca
 601 agacctctc catcagtgac ctgaaggagg tgccgaggaa aaacatcacc ctattcggg
 661 gtctgggcca tggcgcttt ggggaggtgt atgaaggcca ggtgtccgga atgccaacg
 721 acccaagccc cctgcaagtg gctgtgaaga cgctgcctga agtgtgctct gaacaggacg
 781 aactggattt cctcatgaa gccctgatca tcagcaaatt caaccaccag aacattgtc 20
 841 gctgcattgg ggtgagcctg caatccctgc cccggttcat cctgctggag ctcattggcg
 901 ggggagacct caagtcctc ctccgagaga cccgccctcg cccgagccag cctcctccc
 961 tggccatgct ggacctctg cacgtggctc gggacattgc ctgtggctgt cagtattgg
 1021 aggaaaacca cttatccac cgagacattg ctgccagaaa ctgcctctg acctgtccag
 1081 gccctggaag agtggccaag attggagact tcgggatggc ccgagacatc tacagggcga
 1141 gctactatag aaaggaggc tgtgcatgc tgccagtaa gtggatgcc ccagaggcct
 1201 tcatggaagg aatattcact tctaaaacag acacatggtc ctttgagtg ctgctatgg
 1261 aatctttt tcttgat atgccatacc ccagcaaaag caaccaggaa gttctggagt 30
 1321 ttgtcaccag tggaggccg atggaccac ccaagaactg cctgggct gtataccgga
 1381 taatgactca gtgctggcaa catcagcctg aagacaggcc caacttgcc atcatttg
 1441 agaggattga atactgcacc caggaccgg atgtaatcaa caccgcttg ccgatagaat
 1501 atggtccact tgtggaagag gaagagaaag tgctgtgag gcccaaggac cctgagggg
 1561 ttctctct cctggtct caacaggcaa aacgggagga ggagcgagc ccagctgcc
 1621 caccactct gctaccac tctctggca aggtgcaaa gaaaccaca gctgcagagg
 1681 tctctgtc agtccctaga gggccggccg tggaggggg acacgtgaat atggcattct
 1741 ctactcaa cctcctcg gagttgcaca aggtccagg atccagaaac aagccacca 40
 1801 gcttgaggaa ccaacgtac ggctcctggt ttacagagaa accaccaaa aagaataatc
 1861 ctatagcaaa gaaggagcca cagcaggg gtaacctgg gctggagga agctgtactg
 1921 tcccaccta cgttgcaact gggagactt cgggggctc actgctcta gagccctct
 1981 cgctgactgc caatatgaag gaggtacctt tttcaggct acgtcactt ccttgaggga

【表 1 - 4 1】

2041 atgtcaatta cggctaccag caacagggct tggccttaga agccgctact gccctggag
 2101 ctggcatta cgaggatacc attctgaaaa gcaagaatag catgaaccag cctgggcct
 2161 gagctcggtc gcacactcac ttctcttct tgggatccct aagaccgtgg aggagagaga
 2221 ggcaatggct ccttcacaaa ccagagacca aatgtcacgt ttgttttgt gccaacctat
 2281 ttgaagtac caccaaaaaa gctgtatmtt gaaaatgctt tagaaaggtt ttgagcatgg
 2341 gttcatccta ttcttcgaa agaagaaaat atcataaaaa tgagtataa atacaaggcc
 2401 cagatgtgg tgcataaggt tttatgcat gttgttgta tacttctta tgcttcttt
 2461 aaattgtgtg tgctctgct caatgtagc agaattagct gcttctatgt tcatagttg
 2521 gggcataga tgttcttg cctgttgat gtggacatga gccattgag gggagagggg
 2581 acggaaataa aggagttatt tgtaatgact aaaa

10

【表 1 - 4 2】

TFGS-ALKタンパク質配列(AAF42734.1; GI:7229261)*

1 mngqldlsgk liikaqlged irriphned itydelvlmm qrvfrgklls ndevtikykd
 61 edgdlitfd ssdlsfaiqc srilkltlfv ngqprpless qvkylrreli elrnkvnrl
 121 dsleppgepg pstnipenvy rrxhqlqam qmelqspeyk lsklrtstim tdynpnycfa
 181 gktssisdik evprknitli rglghgafge vyegqvsgmp ndpsplqvav ktlpevcseq
 241 deldflmeal iiskfnhqn vrcigvslqs lprfillelm aggdllksflr etrprpsqps
 301 slamldllhv ardiacgcqy leenhfihrd iaarnclltc pgpgrvakig dfgmardiy
 361 asyyrkggca mlpvkwmppe afmegiftsk tdtwsfgvll weifslgymp ypsksnqevl
 421 efvtsggrrmd ppkncpgpv rmtqcwqhq pedrpnfaii lerieyctqd pdvintalpi
 481 eygplveeee kvprpkdpe gvppllvsqq akreeerspa appplptss gkaakkptaa
 541 evsvrvprgp avegghvnma fsqsnppsel hkvhgsrnkp tslwnptygs wftkptkkn
 601 npiakkephd rgnlglegsc tvppnvatgr lpgaslllep ssltanmkev plfrlrhfpc
 661 gnvnygyqqq glpleaatap gaghyedtil ksknsmnqpg p

20

30

ATIC-ALK配列(inv(2)(p23;q35)染色体転座配列)***CLTC-ALK配列(t(2;17)(p23;q23)染色体転座配列)***

40

【表 1 - 4 3】

MSN-ALK 核酸配列(AF295356.1; GI:14625823)

1 aactccgctg cctttgccgc caccatgccc aaaacgatca gtgtgcgtgt gaccaccatg
 61 gatgcagagc tggagtttgc catccagccc aacaccaccg ggaagcagct atttgaccag
 121 gtggtgaaaa ctattggctt gagggaagtt tggttctttg gtctgcagta ccaggacact
 181 aaaggtttct ccactggct gaaactcaat aagaaggtga ctgccagga tgtgcggaag
 241 gaaagcccc tgctcttaa gttccgtgcc aagttctacc ctgaggatgt gtccgaggaa
 301 ttgattcagg acatcactca ggcctgttc tttctgcaag tgaaagaggg catttcaat 10
 361 gatgatattt actgccgcc tgagaccgct gtgctgctgg cctcgtatgc tgtccagtct
 421 aagtatggcg acttcaataa ggaagtgc atagtctggct acctggccgg agacaagttg
 481 ctcccgcaga gagtcttga acagcaciaa ctcaacaagg accagtggga ggagcggatc
 541 caggtgtggc atgaggaaca ccgtggcatg ctcagggagg atgctgtcct ggaatatctg
 601 aagattgctc aagatctgga gatgatggt gtgaactact tcagcatcaa gaacaagaaa
 661 ggctcagagc tgtggctggg ggtggatgcc ctgggttca acatctatga gcagaatgac
 721 agactaactc ccaagatagg ctcccctgg agtgaaatca ggaacatctc tttcaatgat
 781 aagaaatttg tcatcaagcc cattgacaaa aaagccccgg acttcgtctt ctatgctccc 20
 841 cggctgcgga ttaacaagcg gatcttggcc ttgtgcatgg ggaacatga actatacatg
 901 cgccgtcgca agcctgatac cattgagggtg cagcagatga aggcacaggc ccgggaggag
 961 aagcaccaga agcagatgga gcgtgctatg ctggaaaatg agaagaagaa gcgtgaaatg
 1021 gcagagaagg agaaagagaa gattgaacgg gagaaggagg agctgatgga gaggctgaag
 1081 cagatcgagg aacagactaa gaaggctcag caagaactgg aagaacagac ccgtagggct
 1141 ctggaacttg agcaggaacg gaagcgtgcc cagagcgagg ctgaaaagct ggccaaggag
 1201 cgtaagaag ctgaagaggc caaggaggcc ttgctgcagg cctcccggga ccagaaaaag
 1261 actcaggaac agctggcctt ggaaatggca gagctgacag ctgcaatctc ccagctggag 30
 1321 atggcccgac agaagaagga gagtgaggct gtggagtggc agcagaagca ggagctgcaa
 1381 gccatgcaga tggagctgca gagccctgag tacaagctga gcaagctccg cacctcgacc
 1441 atcatgaccg actacaacc caactactgc tttgctggca agacctctc catcagtgac
 1501 ctgaaggagg tgccgcgga aaacatcacc ctattcggg gtctgggcca tggcgccttt
 1561 ggggaggtgt atgaaggcca ggtgtccgga atgcccaacg acccaag

【表 1 - 4 4】

MSN-ALK タンパク質配列 (AAK71522.1; GI:14625824)*

1 mpktisrvvt tmdaelefai qpnttgkqlf dqvvtiglr evwffglqyq dtkgfstwlk
 61 lnkvtaqdv rkespllfkf rakfypedvs eeliqditqr lfflqvkegi Inddiycppe
 121 tavllasyav qskygdfnke vkhsgylagd kllpqrveq hklndqwee riqvwheehr
 181 gmlredavle ylkiaqdlem ygvnyfsikn kkgsewlgv dalgniyeq ndrtpkigf
 241 pwseirnisf ndkkfvikpi dkkapdfvfy aprlriinkri lalcmgnhel ymrrrkpdti
 301 evqqmkaqar eekhqqmer amlenekkr emaekekeki erekeelmer lkqieeqtkk
 361 aqgeleeqtr raleleqerk raqseaekla kerqaeek eallqasrdq kktqeqlale
 421 maeltarisq lemarqkkes eavewqqkqe lqamqmelqs peyklsklirt stimtdynpn
 481 ycfagktssi sdlkevprkn itlirglghg afgevyegqv sgmpndp

10

【表 1 - 4 5】

TPM4-ALK 微量変異体核酸配列 (AF362887.1; GI:14010353)

1 cgagaagtg agggagaaaag gcgggcccgg gaacaggctg aggctgaggt ggctccttg
 61 aaccgtagga tccagctggt tgaagaagag ctggaccgtg ctcaggagcg tgcggaggtg
 121 tctgaactaa aatgtggtga cctggaagaa gaactcaaga atgttactaa caatctgaaa
 181 tctctggagg ctgcatctga aaagtattct gaaaaggagg acaaatatga agaagaaatt
 241 aaacttctgt ctgacaaact gaaagaggct gagaccgtg ctgaatttgc agagagaacg
 301 gttgcaaac tggaaaagac aattgatgac ctggaagtgt acctccggaa gcaccaagag
 361 ctgcaagcca tgcatgga gctgcagagc cctgagtaca agctgagcaa gctccgcacc
 421 ctgac

20

【表 1 - 4 6】

TPM4-ALK 微量変異体タンパク質配列 (AAK51964.1; GI:14010354)

1 revegerrar eqaeaevasl nrriqlveee ldraqeraev selkcgdlee elknvtnnlk
 61 sleaasekys ekedkyeeei kllsdlkea etraefaert vaklektidd levylrkhqe
 121 lqamqmelqs peyklsklirt ld

30

【表 1 - 4 7】

TPM4-ALK 主要変異体核酸配列 (AF362886.1; GI:14010351)

1 ctggcagagt cccgttgccg agagatggat gagcagatta gactgatgga ccagaacctg
 61 aagtgtctga gtgctgctga agaaaagtac tctcaaaaag aagataaata tgaggaagaa
 121 atcaagattc ttactgataa actcaaggag gcagagaccc gtgctgaatt tgagagaga
 181 acggttgcaa aactggaaaa gacaattgat gacctggaag tgtaccgccg gaagcaccag
 241 gagctgcaag ccatgcagat ggagctgcag agccctgagt acaagctgag caagctccgc
 301 acctgac

40

【表 1 - 4 8】

TPM4-ALK 主要変異体タンパク質配列 (AAK51963.1; GI:14010352)

1 laesrcremd eqirlmdqnl kclsaeeeky sqkedkyeee ikiltcklke aetraefaer
61 tvaklektid dlevyrrkhq elqamqmelq speyklsklr tst

MYH9-ALK 配列(t(2;22)(p23;q11.2) 染色体転座配列)***RANBP2-ALK 配列(t(2;2)(p23;q13)または inv(2)(p23;q11-13) 染色体転座配列 s)***

10

ALO17-ALK 配列(t(2;17)(p23;q25) 染色体転座配列)***CARS-ALK 配列(t(2;11;2)(p23;p15;q31) 染色体転座配列)***

* **MSN-ALK**と**MYH-9**を除き、すべての融合タンパク質は**ALK**の最後の**563**アミノ酸を含む。

MSN-ALKと**MYH9**は、それぞれ最後の**567**アミノ酸および**566**アミノ酸を含む。

20

【0023】

「ALK 突然変異」とは、一般に、参照未分化リンパ腫キナーゼ配列と比較した核酸および/またはアミノ酸配列における変化のことをいう。しかしながら、一部の実施の形態では、「ALK 突然変異」とは、ALK 阻害剤（例えば、PF - 02341066 および/または PDD）を用いた治療に対する反応が予測される特定の未分化リンパ腫キナーゼ変異のことを表す場合がある。例えば、野生型の ALK タンパク質（NP_004295）の 1156 部位のシステインアミノ酸（C1156）および/または 1196 部位のロイシンアミノ酸（L1196）の異なるアミノ酸への変異は、本明細書では、ALK 阻害剤に対する耐性を与えるように説明されている。1つの実施の形態では、C1156 部位はチロシンアミノ酸を含み、および/または、L1196 部位はメチオニンアミノ酸を含む。当業者はまた、野生型の ALK タンパク質の「C1156」および「L1196」変異に対応するアミノ酸位置が、ALK 阻害剤（例えば、PF - 02341066 および/または PDD）を用いた治療に対する反応の予測値に影響を及ぼすことなく、異なる参照配列（例えば、ALK 相同体、ALK 融合タンパク質など）と比較して異なる番号を有することを認識するであろう。当業者はさらに、遺伝子コード（以下に示す）によって定義されるように、特定のタンパク質のアミノ酸配列とそのタンパク質をコードできるヌクレオチド配列との間には既知の明確な対応が存在することを認識するであろう。同様に、遺伝子コードによって定義されるように、特定の核酸のヌクレオチド配列と、その核酸によってコードされるアミノ酸配列との間には、既知の明確な対応が存在する。

30

40

【0024】

遺伝子コード

アラニン (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT
システイン (Cys, C)	TGC, TGT
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT

50

ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
リジン (Lys, K)	AAA, AAG
メチオニン (Met, M)	ATG
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
トリプトファン (Trp, W)	TGG
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT
バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
終結シグナル (end)	TAA, TAG, TGA

10

【0025】

遺伝子コードの重要な周知の特性はその冗長性であり、したがって、タンパク質の生成に用いられるアミノ酸の多くでは、1つ以上のコードヌクレオチドトリプレットが用いられうる（例えば、上記参照）。したがって、複数の異なるヌクレオチド配列が、所定のアミノ酸配列をコードしうる。これらのヌクレオチド配列は、すべての有機体において同一のアミノ酸配列を生成することから、これらは機能的に同等であるとみなされる（ある特定の有機体は、幾つかの配列を、他の配列を翻訳するよりも効率的に翻訳する場合があるが）。さらには、時折、所定のヌクレオチド配列に、プリンまたはピリミジンのメチル化変異体が見られることがある。このようなメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸との間のコード関係に影響を及ぼさない。加えて、当業者は、関連するコドンチャートに基づいてコード化されたアミノ酸を特異的に変化させることを目的とした、特定のコードのヌクレオチドを突然変異させる方法を理解するであろう。例えば、Cys-1156のコードは「TGC」であり、Tyrのコードは「TAT」または「TAC」でありうる。よって、コードの位置2における単一のヌクレオチドGのAへの置換は、システインではなくチロシンをコードすることになる。当業者は、同様の操作を行って、他の変異も設計することができる。

20

【0026】

「結合化合物」とは、小分子、抗体、ペプチド、ペプチドリガンドまたは非ペプチドリガンド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸などのオリゴヌクレオチド類似体、レクチン、または、標的タンパク質または分子に特異的に結合する、またはタンパク質複合体などの対象とする検体との安定な複合体を形成する他の分子の実体など、結合組成物のことを称する。

30

【0027】

「結合部分」とは、検体に特異的に結合することが可能な、分子標識が直接的または間接的に付着できる分子を意味する。結合部分としては、限定はしないが、最大で約1000の分子量を有し、水素、炭素、酸素、窒素、硫黄およびリンからなる群より選択される原子を含む、抗体、抗体結合組成物、ペプチド、タンパク質、核酸および有機分子が挙げられる。

40

【0028】

「生体指標」または「マーカー」とは、変化しうる遺伝子、mRNA、またはタンパク質のことであり、ここで、前記変化は癌に関係する。この変化は、正常または健康な組織または細胞（例えば、対照）におけるその量、構造、および/または活性と比較した、癌組織または癌細胞における量、構造、および/または活性における変化であって差し支えなく、癌などの病状に関係する。例えば、癌に関係するまたは抗癌治療法に対する反応性を予測する本発明のマーカーは、癌組織または癌細胞において、正常で健康な組織または細胞と比較して変化したヌクレオチド配列、アミノ酸配列、染色体転座配列、染色体内の逆位、コピー数、発現量、タンパク質レベル、タンパク質活性、またはメチル化状態を有

50

しうる。さらには、「マーカー」は、例えば癌などの病状に係る組織または細胞中に存在する場合に、例えば、ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルにおける野生型の配列とは異なる（例えば置換、欠失、または挿入によって）、その構造が変化した分子、例えば突然変異した分子（突然変異を含む）を含む。

【0029】

「癌」または「腫瘍」という用語は、制御されない増殖、不死、転移能、急速な成長および増殖速度、およびある特定の特有の形態学的特徴など、癌を引き起こす細胞に典型的な特徴を有する細胞の存在のことをいう。癌細胞は、しばしば腫瘍の形態で存在するが、これらの細胞は動物の細胞内で単独で存在する場合があります、あるいは、白血病細胞などの非腫瘍形成性の癌細胞の場合もある。本明細書では「癌」という用語は、前癌状態ならびに悪性の癌を含む。癌としては、限定はしないが、B細胞癌が挙げられ、例えば、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、例えば鎖病、鎖病、 μ 鎖病などの重鎖病、良性単クローン性免疫グロブリン血症、免疫球性アミロイドーシス、黒色腫、乳癌、肺癌（非小細胞肺癌すなわちNSCLCなど）、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳腫瘍または中枢神経系の癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌または子宮内膜癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、胆道癌、小腸癌または虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織の癌、腺癌、炎症性筋線維芽細胞性腫瘍、消化管間質性腫瘍（GIST）、結腸癌、多発性骨髄腫（MM）、骨髄異形成症候群（MDS）、骨髄増殖性疾患（MPD）、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、真性赤血球増加症、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（NHL）、軟部組織の肉腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮細胞肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、扁平上皮細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌（stadenocarcinoma）、髄様癌、気管支原性癌、腎細胞癌、ヘパトーマ、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、骨芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、肝細胞癌、甲状腺癌、胃癌、頭頸部癌、小細胞癌、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症、好酸球増加症候群、全身性肥満細胞症、家族性過好酸球増加症（familial hypereosinophilia）、慢性好酸球性白血病、神経内分泌癌およびカルチノイド腫瘍などが挙げられる。

【0030】

「化学療法剤」とは、例えば癌などの病気の治療に用いられる細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤などの化学物質を意味する。

【0031】

「相補的」とは、2つの核酸鎖の領域間または同一の核酸鎖の領域間の配列相補性についての幅広い概念のことをいう。第1の核酸領域のアデニン残基は、第2の核酸領域の残基がチミンまたはウラシルの場合に、第1の領域に対して逆平行の前記第2の核酸領域の残基と特異的水素結合（「塩基対合」）を形成できることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基は、第2の核酸鎖の残基がグアニンの場合に、第1の鎖に対して逆平行の前記第2の核酸鎖の残基と塩基対合できることが知られている。2つの領域が逆平行に配置されたときに、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対合できる場合、核酸の第1の領域は、同一核酸または異なる核酸の第2の領域と相補的である。ある特定の実施の形態では、第1の領域は第1の部分を含み、第2の領域は第2の部分を含み、したがって、前記第1および第2の部分が逆平行に配置される場合、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。他の実施の形態では、第1の部分のすべてのヌクレオチド残基は、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。

【0032】

「遺伝子のコピー数」または「マーカーのコピー数」とは、特定の遺伝子産物をコードする細胞におけるDNA配列の数のことをいう。一般に、所定の遺伝子では、哺乳動物は、各遺伝子のコピーを2つ有している。しかしながら、コピー数は、遺伝子の増幅または複製によって増加させることができ、あるいは、遺伝子の削除によって減少させることもできる。

【0033】

マーカーが共有的または非共有的に基質に結合している場合には、マーカーの実質画分を基質から解離させることなく基質を流体（例えば、標準食塩クエン酸緩衝液、pH 7.4）ですすぐことができるように、マーカーは基質に「固定」される。

10

【0034】

本明細書では「ハザード比」とは、相対的リスクについての評価を生み出すのに用いられる統計的手法のことをいう。「ハザード比」とは、1つの群の予測ハザードの別の群に対する予測ハザードの比である。例えば、ALK阻害剤で治療した患者集団を、ALK阻害剤を用いていない場合と比べて、ALK阻害剤が、特にALKの突然変異状態に関して、疾患の再発までの期間の増大に有効か否かについて、評価することができる。例えば、本明細書に記載されるように、癌性組織にALK突然変異を包含する被験体の治療は、癌性組織にALK突然変異を有しない被験体と比較して、ALK阻害剤がもたらす治療の有用性の増大を生じさせる。

【0035】

「ALK阻害薬」または「ALK阻害剤」とは、本明細書では、ALKの生物活性を阻害することができる化合物のことをいう。生物活性には、本明細書に記載の患者反応も含まれうる。典型的なALK阻害剤としては、限定はしないが、PF-02341066、PDD、2-メチル-11-(2-メチルプロピル)-4-オキソ-4,5,6,11,12,13-ヘキサヒドロ-2H-インダゾロ[5,4-a]ピロロ[3,4-c]カルバゾール-8-イル[4-(ジメチルアミノ)ベンジル]カルバメート、(1S,2S,3R,4R)-3-({5-クロロ-2-[(1-エチル-2,3,4,5-テトラヒドロ-6-メトキシ-2-オキソ-1H-1-ベンゾアゼピン-7-イル)アミノ]-4-ピリミジニル}アミノ)ピシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-2-カルボキサミド、およびNVP-TAE684が挙げられる（例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる、PNAS 104:270-275, 2007; Choi, Y.L. et al. (2008) Cancer Res. 68:4971-2976; およびBiochemistry 48:3600-3609, 2009を参照）。

20

30

【0036】

本明細書において相互に用いられる「相同性」または「同一性/アイデンティティ」という用語は、2つのポリヌクレオチド配列間または2つのポリペプチド配列間の配列類似性のことをいい、同一性は、より厳密な比較である。「パーセント同一性または相同性」および「%同一性または相同性」という表現は、2つ以上のポリヌクレオチド配列または2つ以上のポリペプチド配列の比較においてみられる配列類似性の割合のことをいう。「配列類似性」とは、2つ以上のポリヌクレオチド配列（適切な方法によって決定される）間の塩基対配列におけるパーセント類似のことを指す。2つ以上の配列は、0~100%の類似性の間のいずれか、またはそれらの間の整数値のいずれかでありうる。同一性または類似性は、比較の目的でアラインメントされうる各配列における位置の比較によって決定することができる。比較配列における位置に同一のヌクレオチド塩基またはアミノ酸が存在している場合、その分子はその位置において同一である。ポリヌクレオチド配列間の類似性または同一性の程度は、共通のポリヌクレオチド配列を有している位置における同一または整合するヌクレオチド数の関数である。ポリペプチド配列の同一性の程度は、共通のポリペプチド配列を有している位置における同一のアミノ酸の数の関数である。ポリペプチド配列の相同性または類似性の程度は、共通のポリペプチド配列を有している位置におけるアミノ酸の数の関数である。本明細書では「実質的相同性」という用語は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも7

40

50

5%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれ以上の相同性のことをいう。

【0037】

癌は、その少なくとも1つの症状が軽減、停止、遅滞、または予防された場合に「阻害」される。本明細書では、癌はまた、癌の再発または転移が低減、遅滞、遅延、または予防された場合にも「阻害」される。

【0038】

「マーカー核酸」または「生体指標核酸」とは、本発明のマーカーによってコードされた核酸、または本発明のマーカーに対応する核酸（例えば、DNA、mRNA、cDNA）である。例えば、これらのマーカー核酸分子は、表1記載の核酸配列のいずれかの全体または部分配列、またはこれらの配列の相補体またはハイブリッド断片を含むDNA（例えば、ゲノムDNAおよびcDNA）を含む。マーカー核酸分子はまた、すべてのチミジン残基がウリジン残基で置換された、表1記載の核酸配列のいずれかの全体または部分配列、またはこれらの配列の相補体を含むRNAを含む。「マーカータンパク質」とは、本発明のマーカーによってコードされたタンパク質、または本発明のマーカーに対応するタンパク質である。マーカータンパク質は、表1記載の配列のいずれかによってコードされたタンパク質の全体または部分配列、またはそれらの断片を含む。本明細書では「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は、相互に用いられる。

【0039】

マーカーの「正常」なコピー数またはマーカーの「正常」な発現レベルとは、例えば癌を患っていないヒトなどの被験体から採取した、例えば、痰、気管支肺胞洗浄、胸水、組織、全血、血清、血漿、頬腔擦取物、唾液、脳脊髄液、尿、排泄物、および骨髓を含めたサンプルなどの生体サンプル中のマーカーの発現レベル、コピー数である。

【0040】

ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカー）の「過剰発現」または「有意に高い発現レベル、コピー数、および/または活性」とは、発現またはコピー数の評価に用いられたアッセイの標準誤差よりも大きい、試験サンプルにおける発現量、コピー数、および/または活性のことをいい、対照サンプル（例えば、癌を患っていない健康な被験体から得たサンプル）のALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカー）の発現量またはコピー数または、幾つかの対照サンプルのALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカー）の発現量またはコピー数の平均値の、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍またはそれ以上でありうる。

【0041】

「プローブ」という用語は、例えば本発明のマーカーなどの明確に意図された標的分子に選択的に結合することができるいずれかの分子のことをいう。プローブは、当業者によって合成されるか、または適切な生物学的調製物に由来しうる。標的分子を検出する目的で、プローブは、本明細書に記載される通りに標識化されるよう、特別に設計されうる。プローブとして使用できる分子の例としては、限定はしないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機モノマーが挙げられる。

【0042】

「RECIST」は「固形癌治療効果判定基準（Response Evaluation Criteria in Solid Tumours）」を表す頭字語を意味し、治療の間に癌患者が好転（「奏功」）、現状を維持（「安定」）または悪化（「進行」）する場合について定義する一連の規則書である。RECISTの基準によって定義される応答は、例えばJournal of the National Cancer Institute, Vol. 92, No. 3, Feb. 2, 2000に公開されており、RECISTの基準は、他の同様に公開されている定義および規則書を含みうる。当業者は、本明細書における「PR」、「CR」、「SD」および「PD」などのRECIST基準に伴う定義を理解するであろう。

【0043】

10

20

30

40

50

治療に「反応する」ことである「反応性」、およびこの動詞の他の形態は、本明細書では、A L K 阻害剤を用いた治療に対する被験体の反応のことを指す。例えば、被験体における腫瘍の増殖が約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90% またはそれ以上停滞した場合、被験体は A L K 阻害剤を用いた治療に反応している。別の例では、例えば、質量% または体積% などの適切な測定法で判定して、被験体における腫瘍が約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50% またはそれ以上縮小した場合、被験体は A L K 阻害剤を用いた治療に反応している。別の例では、被験体が、治療が施されなかった場合に予測される平均余命と比べて約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50% またはそれ以上延長された平均余命を体験する場合、被験体は A L K 阻害剤を用いた治療に反応している。別の例では、被験体が無病生存率の増大、全生存率の増大または無増悪期間の増大を被る場合、被験体は A L K 阻害剤を用いた治療に反応している。上記のような R E C I S T 基準を含め、患者が治療に反応するか否かを判定するために、幾つかの方法が用いられる。

10

20

30

40

50

【0044】

「サンプル」、「組織サンプル」、「患者サンプル」、「患者の細胞または組織サンプル」または「試料」とは、それぞれ、被験体または患者の組織から入手した類似細胞の一群のことをいう。組織サンプルの入手源は、新鮮な、凍結された、および/または貯蔵された、臓器、組織 サンプル、生検、または吸引物；血液または血液成分；脳脊髄液、羊水、腹水または間質液などの体液；または被験体の妊娠または成長時期に得た細胞に由来する固形組織でありうる。組織サンプルは、保存料、抗凝血剤、緩衝剤、固定剤、栄養物、抗生物質など、もともとの組織には自然には混ざらない化合物を含んでいてもよい。

【0045】

被験体における、例えば、マーカーの量が、その量を評価するために用いたアッセイの標準誤差を超えた量、または少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 10 倍またはそれ以上、正常なレベルよりも高いまたは低い場合、A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカー）の発現またはコピー数などのマーカー量は、正常なマーカー量よりも「有意に」高いまたは低い。あるいは、被験体におけるマーカー量が、正常なマーカー量よりも少なくとも約 2 倍、少なくとも約 3 倍、少なくとも約 4 倍、または少なくとも約 5 倍、高いまたは低い場合、被験体におけるマーカー量は、正常な量よりも「有意に」高いまたは低い。

【0046】

本明細書では、「有意事象」とは、当業者によって決定される重要な患者の疾患における事象のことをいう。例えば、有意事象の例としては、限定はしないが、一次診断、死亡、再発、患者の疾患が転移性であるという判定、患者の疾患の再発、または上記ステージの 1 つから別のステージへの患者の疾患の進行が挙げられる。有意事象とは、O S、T T P の評価に用いられる、および/または、R E C I S T または当業者によって決定される他の応答基準を使用する、重要な事象でありうる。

【0047】

本明細書では、「被験体」および「患者」という用語は相互に用いられる。本明細書では、「被験体」という用語は、動物、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ロバ、ヤギ、ラクダ、ネコ、イヌ、モルモット、ラット、マウス、ヒツジ）および霊長類（例えば、マカクザル、ゴリラ、チンパンジーなどのサルおよびヒト）を含めた哺乳動物のことを指す。

【0048】

本明細書では「経時変化」とは、初期事象と後発事象との間の時間量のことをいう。例えば、患者の癌に関連して、経時変化は、患者の疾患に関連していてもよく、疾患の経過における有意事象を測定することによって測定される。例えば、第 1 の事象は診断であり、後発事象は転移でありうる。

【0049】

「無増悪期間」または「T T P」とは、癌の治療開始から進行まで、またはセンサリン

グ（打ち切り）までを測定した時間。センサリングは、試験の終了または治療の変更に起因しうる。無増悪期間はまた、例えば、Kaplein-Meierプロットにおけるような可能性も表すことができ、ここで、無増悪期間は、治療の開始と、進行またはセンサリングとの間の時間である特定の時間の間、進行しない可能性を表している。

【0050】

「転写ポリヌクレオチド」とは、本発明のマーカの転写および、存在する場合には、転写産物の正常な転写後過程（例えば、スプライシング）、および転写産物の逆転写によって生成された、成熟RNAの全部または一部に対して相補的、またはそれらに対して相同性のポリヌクレオチド（例えば、RNA、cDNA、または、RNAまたはcDNAのうちの1つの類似体）である。

10

【0051】

「治療する」、「治療」、およびこの言葉の他の形態は、癌の増殖を遅らせる、癌を重量または体積的に縮小させる、被験体の予測生存期間、および/または腫瘍などの無増悪期間を延長するために、ALK阻害剤を投与することをいう。

【0052】

ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカ）の「低発現」または「有意に低いレベルの発現、コピー数、および/または活性」とは、対照サンプル（例えば、癌を患っていない健康な被験体から得たサンプル）におけるALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカ）の発現量、コピー数、および/または活性、または幾つかの対照サンプルにおけるALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカ）の平均的な発現量、コピー数、および/または活性よりも、例えば、少なくとも2倍、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、または少なくとも10倍またはそれ以上少ない、試験サンプルにおける発現量またはコピー数であって、発現またはコピー数の評価に用いられたアッセイの標準誤差の範囲を超えるものごとをいう。

20

【0053】

II. 典型的な本発明の方法

本発明は、少なくとも一部には、癌の治療における、ALK阻害剤の有効性の予測に関連した、例えば、ALK突然変異を含めたゲノムの特定部位の同定に基づいている。ALK遺伝子発現配列の分析は、ポリペプチドを少なくともある程度ALK阻害剤を用いた治療に対して耐性に変えうる、ALKポリペプチド（例えば、EML4-ALKポリペプチドを含めた表1記載の生体指標）に対する新しい変異の同定をもたらした。したがって、本明細書に記載されるさまざまな方法における、これら生体指標の1つ以上の存在および/または不存在は、本発明の範囲内にある。

30

【0054】

一部の実施の形態では、本発明の方法は、被験体における癌の進行をモニタリングするために用いられて差し支えなく、ここで、例えば、癌の進行の間の第1の時点およびその後の時点において、被験体のサンプルに、本明細書において同定される1つ以上のALK突然変異（例えば、EML4-ALK突然変異）が見られる場合、癌はALK阻害剤介入の治療にはあまり反応しておらず、逆もまた同様である。さらに別の実施の形態では、第1の時点とその後の時点の間に、被験体は、例えば、化学療法、放射線治療、外科手術、または癌の阻害に有用な他の治療的アプローチなどの治療を受けたか、治療を完了したか、または寛解期にある。

40

【0055】

本明細書にさらに記載されるように、本発明の1つ以上の生体指標（例えば、EML4-ALK突然変異を含めたALK突然変異）は、配列番号：1などの参照配列と比較した場合に、ゲノム（例えば、生殖細胞系および/または体細胞）配列に存在することによって明確に同定されうる。例えば、本明細書に記載の方法は、表1記載の変異を1つ以上含むDNAの伸長の標的核酸増幅反応を行うことにより本発明の生体指標を検出し、増幅した標的核酸を1つ以上の変異の存在について分析することを含みうる。

50

【0056】

核酸を増幅するさまざまな技術は当技術分野で知られており、例えば、米国特許第4,683,195号明細書(参照することにより組み込まれる)、米国特許第4,683,202号明細書(参照することにより組み込まれる)および米国特許第4,800,159号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載されるPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)および、特に欧州特許第0569272号明細書に開示されるような一段階方式における代替法RT-PCR(逆転写PCR)、例えば欧州特許出願公開第0201184号明細書に記載されるLCR(リガーゼ連鎖反応)、例えば国際出願公開第WO90/01069号パンフレット(参照することにより組み込まれる)に記載されるRCR(修復連鎖反応)、例えば国際出願公開第WO90/06995号パンフレット(参照することにより組み込まれる)に記載される3SR(自家持続配列複製法)、例えばテンプレートとして二重鎖DNAを使用する、欧州特許第0397269号明細書および米国特許第5,466,586号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載されるNASBA(核酸配列ベース増幅)、および、例えば米国特許第5,399,491号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載されるTMA(転写介在増幅法)が挙げられる。

10

【0057】

増幅産物における1つ以上の変異の存在の検出は、当技術分野で周知のさまざまな方法で行うことができ、例えば、サンガーシーケンス法および大規模シーケンシング(deep sequencing)などのDNA配列決定法;制限酵素の利用;アレル特異的増幅;ペプチド核酸(PNA)介在PCR;一本鎖高次構造多型(SSCP)および変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)分析など、立体配座の差異の検出;標識オリゴヌクレオチドプローブを用いる膜での検出ステップ(ドットプロット)を有するアッセイ、リバーシハイブリダイゼーション、オリゴヌクレオチドライゲーション法(OLA、MLPA)、第1ヌクレオチド変化(FNC)テクノロジー、架橋テクノロジーなどのマイクロタイタープレートにおける検出ステップを有するアッセイ;迅速サイクルPCRおよび同時蛍光分析(例えば5'ヌクレアーゼ/Taqman);およびPCRに続く、質量分析またはキャピラリー電気泳動を用いたミニ配列分析が挙げられる。

20

【0058】

III. 典型的な単離核酸分子

本発明の1つの態様は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドまたはこのようなポリペプチの一部をコードする核酸を含めた、本発明の生体指標に対応する単離核酸分子に関する。本発明の核酸分子は、本明細書において同定されたALKまたはALK関連ゲノム(例えば、生殖細胞系および/または体細胞)領域に存在する核酸分子、および/または、ALKまたはALK関連(例えば、EML4-ALK)ポリペプチドをコードする、核酸分子を含む。一部の実施の形態では、本発明の核酸分子は、表1に提示される核酸配列(nucleic sequences)、またはそれらの断片を含む、それらから実質的になる、またはそれらからなる。本発明の単離核酸分子はまた、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸分子およびこのような核酸分子の断片を含めた、本発明のマーカーに対応する核酸分子を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分な核酸分子を含み、例えば、核酸分子を増幅または変異させるためのPCRプライマーとしての使用に適したものなどが挙げられる。本明細書では「核酸分子」という用語には、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)およびRNA分子(例えば、mRNA)および、ヌクレオチド類似体を使用して生成したDNAまたはRNAの類似体が含まれることが意図されている。核酸分子は一本鎖または二本鎖であって差し支えない;ある特定の実施の形態では、核酸分子は二本鎖DNAである。

30

40

【0059】

「単離」核酸分子とは、核酸分子の天然源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。ある特定の実施の形態では、「単離」核酸分子は、その核酸が由来する有機体のゲノムDNAにおいて、核酸に天然に隣接する(すなわち5'および3'末端に位置する)配列(例えば、タンパク質をコードする配列など)を含まない。例えば、さまざまな実施

50

の形態では、単離核酸分子は、その核酸が由来する細胞のゲノムDNAにおいて、核酸分子に天然に隣接するヌクレオチド配列の約5kB未満、約4kB未満、約3kB未満、約2kB未満、約1kB未満、約0.5kBまたは約0.1kB未満でありうる。さらには、cDNA分子などの「単離」核酸分子は、組み換え技術で産生された場合には、他の細胞物質または培地を実質的に含まない場合があり、あるいは、化学的に合成された場合には、前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まなくてよい。

【0060】

「他の細胞物質または培地を実質的に含まない」をいう表現は、分子が単離されたまたは組み換え技術で生産された細胞の細胞成分からその分子が分離された、核酸分子の調製物を含む。よって、細胞物質を実質的に含まない核酸分子は、他の細胞物質または培地を約30%未満、約20%未満、約10%未満、または約5%未満で有する（乾燥重量で）、核酸分子の調製物を含む。

10

【0061】

例えば表1記載のALK遺伝子変異など、本発明の核酸分子は、標準的な分子生物学的技法および本明細書に記載されるデータベース記録にある配列情報を使用して単離される。標準的なハイブリダイゼーションおよびクローン技術を利用して、これらの核酸配列の全部または一部を用いて、本発明の核酸分子を単離することができる（例えば、Sambrook et al., ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載）。

【0062】

本発明の核酸分子は、テンプレートとしてcDNA、mRNA、またはゲノムDNA（例えば、生殖細胞系および/または体細胞ゲノムDNA）を使用し、標準的なPCR増幅技術に従った適切なオリゴヌクレオチドプライマーを使用して、増幅させることができる。このように増幅された核酸分子は、適切なベクターに組み込まれ、DNA配列分析によって特徴づけられうる。さらには、本発明の核酸分子の全部または一部に対応するオリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成装置を使用する標準的な合成法によって調製することができる。

20

【0063】

別の実施の形態では、本発明の単離核酸分子は、本発明のマーカ−に対応する核酸のヌクレオチド配列、または本発明のマーカ−に対応するタンパク質をコードする核酸のヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列を有する核酸分子を含む。所定のヌクレオチド配列に対して相補的な核酸分子は、所定のヌクレオチド配列に対して十分に相補的なものであり、所定のヌクレオチド配列とハイブリッド形成させ、それによって安定な二本鎖を形成することができる。

30

【0064】

さらには、本発明の核酸分子は核酸配列の一部のみを含んでいてもよく、ここで、完全長の核酸配列は、本発明のマーカ−または、本発明のマーカ−に対応するポリペプチドをコードするものを含む。これらの核酸分子は、例えば、プローブまたはプライマーとして使用することができる。プローブ/プライマーは、典型的には、1つ以上の実質的に精製されたオリゴヌクレオチドとして用いられる。オリゴヌクレオチドは、典型的には、ストリンジェントな条件下で、本発明の核酸の少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約16、少なくとも約17、少なくとも約18、少なくとも約19、少なくとも約20、少なくとも約21、少なくとも約22、少なくとも約23、少なくとも約24、少なくとも約25、少なくとも約26、少なくとも約27、少なくとも約28、少なくとも約29、少なくとも約30、少なくとも約31、少なくとも約32、少なくとも約33、少なくとも約34、少なくとも約35、少なくとも約36、少なくとも約37、少なくとも約38、少なくとも約39、少なくとも約40、少なくとも約45、少なくとも約50、少なくとも約55、少なくとも約60、少なくとも約65、少なくとも約70、少なくとも約75、少なくとも約80、少なくとも

40

50

約 85 kb、少なくとも約 90、少なくとも約 95、少なくとも約 100 またはそれ以上の連続したヌクレオチドとハイブリッド形成させた、ヌクレオチド配列の領域を含む。

【0065】

本発明の核酸分子配列に基づくプローブは、本発明の1つ以上のマーカーに対応する転写産物またはゲノム配列の検出に使用することができる。プローブは、例えば、ラジオアイソトープ、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子など、プローブに結合する標識基を含む。これらのプローブは、例えば、mRNAレベルの検出またはタンパク質をコードする遺伝子に変異または欠失したか否かの判定など、被験体から得た細胞サンプルにおいてタンパク質をコードする核酸分子のレベルを測定することなどによって、タンパク質を誤発現する細胞または組織を同定するための診断検査キットの一部として使用することができる。

10

【0066】

本発明はさらに、ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカー）と実質的に相同性の核酸分子も含み、それらは、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%またはそれ以上の相同性である。他の実施の形態では、本発明はさらに、ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカー）と実質的に相同性の核酸分子も含み、それらは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも21、少なくとも22、少なくとも23、少なくとも24、少なくとも25、少なくとも26、少なくとも27、少なくとも28、少なくとも29、少なくとも30、少なくとも31、少なくとも32、少なくとも33、少なくとも34、少なくとも35、少なくとも36、少なくとも37、少なくとも38、少なくとも39、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100のヌクレオチド、またはこれらの間の範囲のいずれかだけ、異なる。

20

30

【0067】

「単一ヌクレオチド多型」(SNP)という用語は、アレル配列間の変化部位である、単一ヌクレオチドによって占められた多型部位を表す。この部位は、アレルの高度に保存された配列（例えば、母集団の1/100または1/1000未満で変化する配列）の前方および後方に存在する。SNPは、通常、多型部位において、1つのヌクレオチドが別のヌクレオチドに置換されることに起因して生じる。SNPは、参照アレルに関連するヌクレオチドの削除またはヌクレオチドの挿入からも生じうる。典型的には、多型部位は、参照塩基以外の塩基によって占有される。例えば、参照アレルが多型部位に塩基「T」（チミジン）を含む場合、変異アレルは、多型部位に「C」（シチジン）、「G」（グアニン）、または「A」（アデニン）を含みうる。SNPは、タンパク質をコードする核酸配列に生じうるが、その場合、欠陥タンパク質またはその他の変異体タンパク質、もしくはは遺伝的疾患を生じうる。このようなSNPは、遺伝子コード配列を変化させて別のアミノ酸（「ミスセンス」SNP）を指定するか、あるいは、SNPは、終止コドン（「ノンセンス」SNP）を導入する場合もある。SNPがタンパク質のアミノ酸配列を変化させない場合には、SNPは「サイレント」と称される。SNPは、ヌクレオチド配列の非コード領域にも生じることがある。これは、例えば選択的スプライシングの結果として、欠陥タンパク質の発現を生じるか、あるいは、タンパク質の機能に影響を有しない場合もある。

40

50

【 0 0 6 8 】

別の実施の形態では、本発明の単離核酸分子は、少なくとも7、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50、少なくとも55、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも90、少なくとも95、少なくとも100、少なくとも125、少なくとも150、少なくとも175、少なくとも200、少なくとも250、少なくとも300、少なくとも350、少なくとも400、少なくとも450、少なくとも550、少なくとも650、少なくとも700、少なくとも800、少なくとも900、少なくとも1000、少なくとも1200、少なくとも1400、少なくとも1600、少なくとも1800、少なくとも2000、少なくとも2200、少なくとも2400、少なくとも2600、少なくとも2800、少なくとも3000、少なくとも3500、少なくとも4000、少なくとも4500、またはそれ以上のヌクレオチド長を有し、ストリンジェントな条件下で、本発明のマーカーに対応する核酸分子または本発明のマーカーに対応するタンパク質をコードする核酸分子とハイブリッド形成する。本明細書では、「ストリンジェントな条件下でハイブリッド形成する」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件を表現することが意図されており、この条件下では、典型的には、互いに、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、または少なくとも85%が同一のヌクレオチド配列が、互いにハイブリッド形成したままである。このような厳しい条件は当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989)のsections 6.3.1-6.3.6から入手できる。厳しいハイブリダイゼーション条件の別の非限定的な例は、約45における6×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)のハイブリダイゼーションの後、続いて50~65における0.2×SSC、0.1%のSDSでの1回以上の洗浄である。

10

20

【 0 0 6 9 】

本発明はまた、本発明の核酸分子に対して相補的な少なくとも1つの領域を有する分子指標核酸分子も含み、したがって、分子指標は、サンプル中の本発明の核酸分子の存在を定量するのに有用である。「分子指標」核酸は、一对の相補的領域を含み、かつ、フルオロフォアおよびそれに関連する蛍光クエンチャーを有する核酸分子である。フルオロフォアおよびクエンチャーは、相補的領域が互いにアニーリングされる場合に、クエンチャーによってフルオロフォアの蛍光がクエンチされる位置(orientation)における、核酸の異なる部分と関連している。核酸分子の相補的領域が互いにアニールされない場合、フルオロフォアの蛍光はそれほどではないがクエンチされる。分子指標核酸分子は、例えば、米国特許第5,876,930号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載される。

30

【 0 0 7 0 】

I V . 典型的な単離タンパク質および抗体

本発明の1つの態様は、本発明の個別のマーカーに対応する単離タンパク質、およびそれらの生物学的に活性な部分に関連する。1つの実施の形態では、マーカーに対応する天然のポリペプチドは、標準的なタンパク質精製法を使用した適切な精製スキームによって、細胞源または組織源から単離することができる。別の実施の形態では、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、遺伝子組み換え技術によって産生される。組み換え発現に替えて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、標準的なペプチド合成法を使用して化学的に合成することもできる。

40

【 0 0 7 1 】

「単離」または「精製」したタンパク質、またはそれらの生物学的に活性な部分は、そのタンパク質が得られた細胞源または組織源に由来する細胞物質または他の夾雑タンパク質を実質的に含まない、または、化学的に合成された場合には、前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という表現は、タンパク質が単離された細胞または組み換え技術によって産生された細胞の細胞成分からタンバ

50

ク質を分離したタンパク質調製物を含む。よって、細胞物質を実質的に含まないタンパク質は、約30%未満、約20%未満、約10%未満、または約5%未満（乾燥重量で）の異種タンパク質（本明細書では「夾雑タンパク質」とも称される）を有するタンパク質調製物を含む。タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分が組み換え技術によって産生された場合には、それらは培地を実質的に含まない場合があり、すなわち、培地は、タンパク質調製物の体積の約20%未満、約10%未満、または約5%未満を示す。タンパク質が化学合成によって生成される場合、そのタンパク質は、前駆体化学物質または他の化学物質を実質的に含まない場合があり、すなわち、そのタンパク質は、該タンパク質合成に関連する前駆体化学物質または他の化学物質から分離される。したがって、このようなタンパク質調製物は、対象ポリペプチド以外の前駆体化学物質または化合物を約30% 10
 未満、約20%未満、約10%未満、約5%未満（乾燥重量で）有する。

【0072】

本発明のマーカ−に対応するポリペプチドの生物学的に活性な部分は、本発明のALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカ−）に対応するタンパク質のアミノ酸配列と十分に同一であるか、そのアミノ酸配列に由来したアミノ酸配列を含むポリペプチドを含み、前記ポリペプチドは、完全長タンパク質よりも少数のアミノ酸を含み、かつ、対応する完全長タンパク質の少なくとも1つの活性を示す。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つ活性を有するドメインまたはモチーフを含む。本発明のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 20
 、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100またはそれ以上のアミノ酸長を有するポリペプチドでありうる。さらには、タンパク質の他の領域が削除された、他の生物学的に活性な部分は、組み換え技術によって調製されて、本発明のポリペプチドの天然型の1つ以上の機能活性について評価されうる。

【0073】

ある特定の実施の形態では、ポリペプチドは、表1に記載される核酸分子にコードされるタンパク質のアミノ酸配列を有する。他の有用なタンパク質は、これらの配列の1つと実質的に同一（例えば、少なくとも60、少なくとも65、少なくとも70、少なくとも75、少なくとも80、少なくとも85、少なくとも86、少なくとも87、少なくとも 30
 88、少なくとも89、少なくとも90、少なくとも91、少なくとも92、少なくとも93、少なくとも94、少なくとも95、少なくとも96、少なくとも97、少なくとも98、少なくとも99、少なくとも99.5%またはそれ以上）であり、アミノ酸配列は異なっているが、対応する完全長タンパク質の機能活性（例えば、ALK阻害剤に対する耐性または感受性を与える）を保持する。

【0074】

2つのアミノ酸または2つの核酸の配列のパーセント同一性を決定するため、配列は、最適な比較の目的でアラインメントされる（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アラインメントを目的として、第1のアミノ酸配列または核酸配列にギャップを導入することができる）。次に、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置において、アミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占められている場合、分子はその位置において同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、該配列によって共有される同一の位置の数の関数である（すなわち、%同一性 = 同一の位置の数 / 全体の位置の数（例えば、重複部分）× 100）。1つの実施の形態では、2つの配列の長さは、同一である。 40

【0075】

2つの配列間のパーセント同一性の決定は、数学アルゴリズムを利用して達成することができる。2つの配列の比較に有用な数学アルゴリズムの別の非限定的な例は、Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268のアルゴリズムであり、 50

Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877などで修正されている。このようなアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410のNB L A S TおよびXB L A S Tプログラムに組み込まれる。本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得るために、score = 100、wordlength = 12のNB L A S Tプログラムを用いて、B L A S Tヌクレオチド検索を行うことができる。また、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得るために、score = 50、wordlength = 3のXB L A S Tプログラムを用いて、B L A S Tタンパク質検索を行うことができる。比較目的でギャップアラインメント (gapped alignments) を得るために、Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402に記載されるようにギャップ化B L A S Tを用いることができる。あるいは、分子間の距離関係を検出する反復検索 (iterated search) を行うために、P S I - B l a s tを用いることができる。B L A S T、ギャップ化B L A S T、およびP S I - B l a s tプログラムを使用する場合、各プログラム (例えば、XB L A S TおよびNB L A S T) のデフォルトパラメータを用いることができる (ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.govのNC B Iのウェブサイトを参照)。配列の比較に有用な数学アルゴリズムの別の非限定的な例は、Myers and Miller, (1988) Comput Appl Bio sci, 4:11-7のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、G C G配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるA L I G Nプログラム (version 2.0) に組み込まれる。アミノ酸配列の比較にA L I G Nプログラムを利用する場合、P A M 1 2 0重量残基表 (weight residue table)、ギャップ長ペナルティー12、およびギャップペナルティー4を使用することができる。局所的配列類似性およびアラインメントの領域を同定するためのさらに別の有用なアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448に記載されるF A S T Aアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の比較にF A S T Aアルゴリズムを使用する場合、k - タプル値2でP A M 1 2 0重量残基表を使用することができる。

10

20

30

40

50

【0076】

2つの配列間のパーセント同一性は、ギャップ化あり、またはギャップ化なしで、上述のものと類似した技術を利用して決定することができる。パーセント同一性の計算では、完全一致したもののみがカウントされる。

【0077】

本発明のマーカーに対応する単離ポリペプチド、またはそれらの断片は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の調製の標準的な技法を用いて抗体を産生するための免疫原として使用することができる。完全長のポリペプチドまたはタンパク質を用いることもできるが、もう1つの方法として、本発明は、免疫原として使用するための抗原性ペプチド断片を提供する。本発明のタンパク質の抗原性ペプチドは、本発明のポリペプチドの1つのアミノ酸配列のアミノ酸残基を、少なくとも8つ (または少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、または少なくとも30またはそれ以上) 含み、また、タンパク質のエピトープも包含し、したがって、前記ペプチドに対する抗体が、前記タンパク質に対応する本発明のマーカーと特異的な免疫複合体を形成する。抗原性ペプチドに包含される典型的なエピトープは、例えば親水性の領域など、タンパク質表面に位置する領域である。疎水性配列分析、親水性配列分析、または同様の分析を使用して、親水性の領域を同定することができる。

【0078】

免疫原は、典型的には、ウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動物または脊椎動物などの適切な (すなわち、免疫応答性の) 被験体に免疫を付与することによる抗体の調製に用いられる。適切な免疫原性調製物は、例えば、組み換え発現させたまたは化学的に合成したポリペプチドでありうる。調製物はさらに、完全または不完全フロイントアジュバントなどのアジュバント、または同様の免疫刺激薬を含みうる。

【0079】

したがって、本発明の別の態様は、本発明のポリペプチドに対する抗体に関する。本明細書において相互に用いられる「抗体」および「抗体物質」という用語は、免疫グロブリン

ン分子および該免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分を表す、すなわち、分子は、本発明のポリペプチドなどの抗原を特異的に結合する抗原結合部位を含む。本発明の所定のポリペプチドに特異的に結合する分子は、ポリペプチドと結合するが、例えばポリペプチドを天然に含む生体サンプルなどのサンプル中の他の分子とは実質的に結合しない分子である。免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分の例としては、抗体をペプシンなどの酵素で処理することによって生成することができるF(a b)およびF(a b')₂断片が挙げられる。本発明は、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を提供する。「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、本明細書では、特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を1つだけ含む抗体分子の集団のことを表す。

10

【0080】

ポリクローナル抗体は、免疫原として本発明のポリペプチドを有する適切な被験体に免疫を付与することによって、上述のように調製することができる。免疫付与した被験体の抗体力価は、固定化したポリペプチドを使用する酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)などの標準的な技法を用いることによって、経時的にモニタリングすることができる。必要に応じて、抗体分子は、被験体(例えば、被験体の血液または血清)から採取または単離され、さらに、プロテインAクロマトグラフィーなどの周知の技術によって精製され、それによってIgG画分が得られる。免疫付与後の適切な時期、例えば、特定の抗体力価が最も高いときなどに、抗体産生細胞を被験体から採取し、Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497に最初に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al., 1983, Immunol. Today 4:72参照)、EBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., pp. 77-96 In Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 1985参照)またはトリオーマ技法などの標準的な技法を用いて、モノクローナル抗体の調製に使用することができる。ハイブリドーマの産生技術は周知である(一般にCurrent Protocols in Immunology, Coligan et al. ed., John Wiley & Sons, New York, 1994参照)。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準的なELISA法を使用して、対象ポリペプチドと結合する抗体についてハイブリドーマ培養上清をスクリーニングすることによって検出される。

20

【0081】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する別の方法として、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、対象ポリペプチドを用い、組換え組合せ免疫グロブリンライブラリ(例えば、抗体ファージディスプレイライブラリ)をスクリーニングすることによって、同定および単離することができる。ファージディスプレイライブラリを生成およびスクリーニングするためのキットは市販されている(例えば、Pharmacia組換えファージ抗体システム、カタログ番号: 27-9400-01; およびStratagene SurfZAPファージディスプレイキット、カタログ番号: 240612)。加えて、抗体ディスプレイライブラリの生成およびスクリーニングにおける使用に特に利用可能な方法および試薬の例は、例えば、米国特許第5,223,409号明細書(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO92/18619号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO91/17271号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO92/20791号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO92/15679号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO93/01288号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO92/01047号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO92/09690号パンフレット(参照することにより組み込まれる); 国際出願公開第WO90/02809号パンフレット(参照することにより組み込まれる); Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734に記載されている。

30

40

50

【 0 0 8 2 】

加えて、標準的な遺伝子組み換え技術を使用して産生できる、ヒトおよび非ヒトの両方の部分を含む、キメラ化およびヒト化モノクローナル抗体などの組み換え抗体は、本発明の範囲内にある。これらのキメラ化およびヒト化モノクローナル抗体は、例えば、国際出願公開第 W O 8 7 / 0 2 6 7 1 号パンフレット（参照することにより組み込まれる）；欧州特許出願公開第 1 8 4 , 1 8 7 ；欧州特許出願公開第 1 7 1 , 4 9 6 号明細書；欧州特許出願公開第 1 7 3 , 4 9 4 号明細書；国際出願公開第 W O 8 6 / 0 1 5 3 3 号パンフレット（参照することにより組み込まれる）；米国特許第 4 , 8 1 6 , 5 6 7 号明細書（参照することにより組み込まれる）；欧州特許出願公開第 1 2 5 , 0 2 3 号明細書；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U SA 84:3439-3443; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-449; and Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi et al. (1986) Bio/Techniques 4:214 ; 米国特許第 5 , 2 2 5 , 5 3 9 号明細書（参照することにより組み込まれる）；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534 ; および Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060 などに記載される方法を用いて、当技術分野で既知の遺伝子組み換え技術によって産生することができる。

10

【 0 0 8 3 】

完全ヒト抗体は、ヒト被験体の治療的処置には特に望ましい。このような抗体は、ヒト重鎖および軽鎖遺伝子を発現する内在性の免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子を発現することができないトランスジェニックマウスを使用して産生させることができる。トランスジェニックマウスは、例えば、本発明のマーカーに対応するポリペプチドの全部または一部など、選択された抗原を用いて通常の方法で免疫付与される。抗原に対するモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して得ることができる。トランスジェニックマウスに含まれるヒト免疫グロブリン・トランス遺伝子は、B細胞の分化の間に再配列され、その後、クラススイッチおよび体細胞変異を被る。よって、これらの技術を用いて、治療に有用な I g G、I g A 及び I g E 抗体を産生することができる。ヒト抗体の産生のためのこの技術の概観については、Lonberg and Huszar (1995) Int. Rev. Immunol. 13:65-93を参照。ヒト抗体およびヒトモノクローナル抗体の産生のためのこの技術の詳細な論述およびこれら抗体の産生プロトコルについては、例えば、米国特許第 5 , 6 2 5 , 1 2 6 号明細書（参照することにより組み込まれる）；米国特許第 5 , 6 3 3 , 4 2 5 号明細書（参照することにより組み込まれる）；米国特許第 5 , 5 6 9 , 8 2 5 号明細書（参照することにより組み込まれる）；米国特許第 5 , 6 6 1 , 0 1 6 号明細書（参照することにより組み込まれる）；および米国特許第 5 , 5 4 5 , 8 0 6 号明細書（参照することにより組み込まれる）を参照。加えて、A b g e n i x , I n c . (米国カリフォルニア州フリーモント所在) などの会社は、上述の技術と同様の技術を使用した、選択された抗原に対するヒト抗体の提供を請け負い可能である。

20

30

【 0 0 8 4 】

選択されたエピトープを認識する完全ヒト抗体は、「誘導選択」と称される技術を使用して産生することができる。このアプローチでは、同一のエピトープを認識する完全ヒト抗体の選択を誘導することを目的として、例えばネズミ科の抗体などの選択された非ヒトモノクローナル抗体が用いられる (Jespers et al., 1994, Bio/technology 12:899-903)。

40

【 0 0 8 5 】

本発明のマーカーに対応するポリペプチドに対する抗体（例えばモノクローナル抗体）は、親和性クロマトグラフィーまたは免疫沈降などの標準的な技法によるポリペプチドの単離に使用することができる。さらには、このような抗体は、マーカー発現のレベルおよびパターンを評価することを目的とした、マーカー（例えば、細胞溶解物または細胞上清

50

中)の検出に用いることができる。抗体はまた、例えば、所定の治療計画の有効性を決定するための、例えば臨床試験手順の一部として、組織または体液(例えば、腫瘍細胞含有体液)におけるタンパク質レベルをモニタリングするために、診断的にも使用することができる。検出可能な物質に抗体を結合することにより、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例としては、限定はしないが、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。適切な酵素の例としては、限定はしないが、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、限定はしないが、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられる；適切な蛍光物質の例としては、限定はしないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる；発光物質の例としては、限定はしないが、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、限定はしないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびイクオリンが挙げられる；適切な放射性物質の例としては、限定はしないが、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が挙げられる。

【0086】

V. 典型的な組み換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明のもう1つの態様は、本発明のマーカーに対応するポリペプチド(またはこのようなポリペプチドの一部)をコードする核酸を含む、発現ベクターなどのベクターに関する。本明細書では、「ベクター」という用語は、別の核酸に結合して輸送することができる核酸分子を表す。ベクターの1つの型は「プラスミド」であり、これは、追加のDNA断片が連結する環状二重鎖DNAループを表す。別のタイプのベクターは、追加のDNA断片がウイルスゲノムに連結されうる、ウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳類ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、宿主ゲノムとともに複製される。さらには、ある特定のベクター、すなわち発現ベクターは、動作可能に連結した遺伝子の発現を検出することができる。一般に、遺伝子組み換え技術に有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミド(ベクター)の形態をしている。しかしながら、本発明は、同等の機能を果たす、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)など、発現ベクターの他の形態も含むことが意図されている。

【0087】

本発明の組み換え発現ベクターは、宿主細胞における核酸の発現に適した本発明の核酸を含む。これは、組み換え発現ベクターが、発現する核酸配列に動作可能に連結した、発現に使用するために宿主細胞に基づいて選択された1つ以上の制御配列を含むことを意味する。組み換え発現ベクター内において、「動作可能に連結」とは、対象ヌクレオチド配列が、ヌクレオチド配列の発現(例えば、インビトロ転写/翻訳系において、またはベクターが宿主細胞内に導入される際に宿主細胞において)が可能な方法で制御配列に連結されることを意味することが意図されている。「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサーおよび他の発現制御要素(例えば、ポリアデニル化信号)を含むことが意図されている。これらの制御配列は、例えば、Goeddel, *Methods in Enzymology: Gene Expression Technology* vol.185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に記載されている。制御配列は、多くのタイプの宿主細胞におけるヌクレオチド配列の構成的発現を対象とするもの、および、ある特定の宿主細胞(例えば、組織特異的制御配列)におけるヌクレオチド配列の発現のみを対象とするものを含む。発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に応じて決まりうることは当業者に認識されよう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、それによって、本明細書記載の核酸にコードされた、融合タンパク質またはペプチドを含めたタンパク質またはペプチドを産生することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

本発明の組み換え発現ベクターは、原核細胞（例えば、大腸菌（*E. Coli*））または真核細胞（例えば、昆虫細胞 { パキユロ・ウイルス発現ベクターを使用 }、酵母細胞または哺乳動物細胞）において、本発明のマーカに対応するポリペプチドを発現するように設計することができる。適切な宿主細胞は、上記Goeddelの文献においてさらに論述されている。あるいは、組み換え発現ベクターは例えばT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを利用して、インビトロにおいて転写および翻訳することができる。

【 0 0 8 9 】

原核生物におけるタンパク質の発現は、ほとんどの場合、融合または非融合タンパク質のいずれかの発現を目的とする構成的プロモーターまたは誘導プロモーターを含むベクターを用いて、大腸菌（*E. Coli*）において行われる。融合ベクターは、内部にコードされたタンパク質、通常は組み換えタンパク質のアミノ末端に、多くのアミノ酸を加える。このような融合ベクターは、典型的には次の3つの目的：1）組み換えタンパク質の発現の増大；2）組み換えタンパク質の溶解性の増大；および3）アフィニティー精製におけるリガンドとしての働きをすることによる、組み換えタンパク質の精製の補助、を果たす。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、融合タンパク質の精製後に融合部分から組み換えタンパク質を分離できるようにするため、融合部分と組み換えタンパク質の接合部位にタンパク質分解性切断部位が導入される。これらの酵素およびそれらの同族認識配列として、第Xa因子、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。典型的な融合発現ベクターとしては、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）、マルトースE結合タンパク質、またはプロテインAを標的組み換えタンパク質と融合させる、pGEX（Pharmacia Biotech Inc社製；Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40）、pMAL（New England Biolabs社製（米国マサチューセッツ州ベバリー所在））およびpRIT5（Pharmacia社製（米国ニュージャージー州ピスカタウェイ所在））が挙げられる。

【 0 0 9 0 】

適切な誘導非融合大腸菌（*E. Coli*）発現ベクターの例としては、pTrc（Amann et al., 1988, Gene 69:301-315）およびpET 11d（Studier et al., p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol.185, Academic Press, San Diego, CA, 1991）が挙げられる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現は、ハイブリッド *trp-lac* 融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依拠している。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、共発現したウイルスRNAポリメラーゼ（T7 *gn1*）が介在するT7 *gn10-lac* 融合プロモーターからの転写に依拠している。このウイルスポリメラーゼは、*lacUV5* プロモーターの転写制御下、T7 *gn1* 遺伝子を包含する内在性のプロファージによって、宿主株BL21（DE3）またはHMS174（DE3）により供給される。

【 0 0 9 1 】

大腸菌（*E. Coli*）における組み換えタンパク質の発現を最大にするための1つの戦略は、タンパク質分解によって組み換えタンパク質を切断する能力を損なった宿主細菌においてタンパク質を発現させることである（Gottesman, p. 119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990）。別の戦略は、各アミノ酸についての個々のコドンが大腸菌（*E. Coli*）においてとりわけ利用されるように、発現ベクター内に挿入される核酸の核酸配列を変化させることである（Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118）。本発明の核酸配列のこのような変化は、標準的なDNA合成法によって行うことができる。

【 0 0 9 2 】

別の実施形態では、発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母サッカロミセス・セレビシエ（*S. cerevisiae*）における発現用ベクターの例としては、pYepSec1（Baldari et al., 1987, EMBO J. 6:229-234）、pMfa（Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943）、pJRY88（Schultz et al., 1987, Gene 54:113-123）、pY

10

20

30

40

50

E S 2 (Invitrogen Corporation社製 (米国カリフォルニア州サンディエゴ所在))、および p i c Z (Invitrogen Corporation社製 (米国カリフォルニア州サンディエゴ所在))、が挙げられる。

【0093】

あるいは、発現ベクターはバキュロウイルス発現ベクターである。培養昆虫細胞 (例えば、S f 9細胞) におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、p A c シリーズ (Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3:2156-2165)、および p V L シリーズ (Lucklow and Summers, 1989, Virology 170:31-39) が挙げられる。

【0094】

さらに別の実施の形態では、核酸は哺乳動物発現ベクターを使用して哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現ベクターの例としては、p C D M 8 (Seed, 1987, Nature 329:840) および p M T 2 P C (Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6:187-195) が挙げられる。哺乳動物細胞に用いられる場合には、発現ベクターの制御機能は、多くの場合にはウイルス調節要素によって提供される。例えば、一般的に使用されているプロモーターは、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞の両方のための他の適切な発現システムについては、Sambrook et al., ed., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の第16章および17章を参照のこと。

【0095】

別の実施の形態では、組み換え哺乳動物発現ベクターは、特定の細胞型における核酸の発現を導くことができる (例えば、組織特異的調節要素が核酸の発現に用いられる)。組織特異的調節要素は当技術分野で公知である。適切な組織特異的プロモーターの非限定的な例としては、アルブミンプロモーター (肝臓特異的; Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1:268-277); T細胞受容体のプロモーター (Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8:729-733) および免疫グロブリンのプロモーター (Banerji et al., 1983, Cell 33:729-740; Queen and Baltimore, 1983, Cell 33:741-748) などのリンパ特異的プロモーター (Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43:235-275); ニューロン特異的プロモーター (例えば、ニューロフィラメントプロモーター; Byrne and Ruddle, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター (Edlund et al., 1985, Science 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター (例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4,873,316号明細書 (参照することにより組み込まれる) および欧州特許出願公開第264,166号明細書) が挙げられる。発生過程で調節されるプロモーターもまた包含され、例えば、マウス h o x プロモーター (Kessel and Gruss, 1990, Science 249:374-379) および - フェトプロテインプロモーター (Camper and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3:537-546) が挙げられる。

【0096】

本発明はさらに、アンチセンス配向で発現ベクターに組み込まれた本発明のDNA分子を含む組み換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに対してアンチセンスのRNA分子の発現 (DNA分子の転写による) を可能にする方法で制御配列に動作可能に連結される。アンチセンス配向で組み込まれた核酸に動作可能に連結された制御配列は、例えばウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサーなど、さまざまな細胞型におけるアンチセンスRNA分子の連続発現を誘導するように選択することができ、あるいは、制御配列は、アンチセンスRNAの構成的、組織特異的または細胞型特異的発現を誘導するように選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、組み換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であって差し支えなく、ここで、アンチセンス核酸は、高効率調節領域の調節下で産生され、その活性は、ベクターが導入される細胞型によって決定されうる。アンチセンス遺伝子を使用する遺伝子発現の調節の論述については、Weintraub et al., 1986, Trends in Genetics, Vol. 1(1)を参照。

10

20

30

40

50

【0097】

本発明のもう1つの態様は、本発明の組み換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組み換え宿主細胞」という用語は、本明細書では相互に用いられる。これらの用語は、特定の対象細胞のみならず、これらの細胞の子孫または可能性のある子孫 (potential progeny) も意味することが理解されよう。変異または環境の影響のいずれかに起因して、ある特定の修飾が継代において生じ得ることから、その子孫は、実際には親細胞とは同一ではないかもしれないが、本明細書においては用語の範囲内に含まれる。

【0098】

宿主細胞は、原核細胞 (例えば、大腸菌 (E. Coli)) または真核細胞 (例えば、昆虫細胞、酵母または哺乳動物細胞) のいずれかでありうる。

10

【0099】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション法によって原核細胞または真核細胞に導入することができる。本明細書では、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウムの共沈、DEAEデキストラン介在性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含めた、外来核酸を宿主細胞に導入するためのさまざまな当技術分野で認識されている技術を表すことが意図されている。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに適した方法は、上述のSambrookらの参考文献、および他の実験マニュアルで確認することができる。

20

【0100】

哺乳動物細胞の安定なトランスフェクションのためには、使用する発現ベクターおよびトランスフェクションの技法に応じて、細胞の小画分のみが、外来DNAをそれらのゲノムに組み込みうるということが知られている。これらの成分を同定および選択するために、一般的には、選択可能なマーカー (例えば、抗生物質に対する耐性のため) をコードする遺伝子が、対象の遺伝子と一緒に宿主細胞に導入される。典型的な選択可能なマーカーは、G418、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートなど、薬物に対する耐性を与えるものを含む。導入核酸を安定にトランスフェクトされた細胞は、薬剤選択によって同定することができる (例えば、選択可能なマーカー遺伝子を導入されている細胞は、他の細胞が死滅するのに対し、生存するのであろう)。

30

【0101】

培養した原核細胞または真核宿主細胞など、本発明の宿主細胞を用いて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドを生成することができる。したがって、本発明はさらに、本発明の宿主細胞を用いて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドを生成する方法を提供する。1つの実施の形態では、本方法は、本発明の宿主細胞 (本発明のポリペプチドをコードする組み換え発現ベクターを導入したもの) をマーカーが産生されるように適切な培地で培養することを含む。別の実施の形態では、本方法はさらに、マーカーポリペプチドを培地または宿主細胞から単離することを含む。

【0102】

本発明の宿主細胞はまた、非ヒト・トランスジェニック動物を産生するのに使用することもできる。例えば、1つの実施の形態では、本発明の宿主細胞は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする配列が導入されている受精卵母細胞または胚幹細胞である。次に、これらの宿主細胞を用いて非ヒト・トランスジェニック動物を作出することができ、ここで、本発明のマーカータンパク質をコードする外因性配列がそれらのゲノムまたは相同の組み換え動物に導入されており、本発明のマーカーに対応するポリペプチド配列をコードする内在性の遺伝子は変化している。これらの動物は、ポリペプチド活性のモジュレータを同定および/または評価することを目的とした、本マーカーに対応するポリペプチドの機能および/または活性の研究、ならびに、マーカーの発見または評価、例えば、治療用マーカーおよび診断マーカーの発見または評価を目的とした、または薬物の有効性および特異性の代用として、治療用または診断用分子の前臨床試験に有用である。

40

50

【0103】

本明細書では、「トランスジェニック動物」は非ヒト動物、例えば、哺乳動物であり、例えば、ラットまたはマウスなどの齧歯動物であり、ここで、動物の1つ以上の細胞は、トランス遺伝子を含む。トランスジェニック動物の他の例としては、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが挙げられる。トランス遺伝子は、トランスジェニック動物が発現し、成体動物のゲノムにとどまり、したがってトランスジェニック動物の1つ以上の細胞型または組織におけるコードされた遺伝子産物の発現を検出する、細胞のゲノムに組み込まれた外来性DNAである。本明細書では「相同組み換え動物」とは、哺乳動物、例えばマウスなどの非ヒト動物であり、ここで、内在性の遺伝子は、内在性の遺伝子と、例えば動物の成長前の動物胚細胞などの動物細胞に導入された外来性DNA分子との間の相同組み換えによって変化している。トランスジェニック動物はまた、誘導トランスジェニック動物も含み、例えば、Chan I.T., et al. (2004) J Clin Invest . 113(4):528-38およびChin L. et al (1999) Nature 400(6743):468-72に記載されるものなどが挙げられる。

10

【0104】

本発明のトランスジェニック動物は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードした核酸を受精卵母細胞の雄性前核に、例えば、マイクロ・インジェクション、レトロウイルス感染により導入すること、および、偽妊娠の雌性里親動物 (pseudopregnant female foster animal) 中で前記卵母細胞を発生させることによって作出できる。また、イントロン配列およびポリアデニル化信号を、トランス遺伝子に含めることにより、トランス遺伝子の発現効率を増加させることができる。組織特異的制御配列は、トランス遺伝子に動作可能に連結されることにより、特定の細胞に本発明のポリペプチドの発現を導くことができる。胚操作およびマイクロ・インジェクション介したトランスジェニック動物 (特にマウスなどの動物) の産生方法は、当技術分野において従来技術となっており、例えば、米国特許第4,736,866号明細書 (参照することにより組み込まれる) および4,870,009号明細書 (参照することにより組み込まれる)、米国特許第4,873,191号明細書 (参照することにより組み込まれる) およびHogan, Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986に記載されている。

20

【0105】

同様の方法が他のトランスジェニック動物の作出にも使用される。初代トランスジェニック動物は、そのゲノムにおけるトランス遺伝子の存在および/または前記動物の組織または細胞におけるトランス遺伝子をコードするmRNAの発現に基づいて同定することができる。初代トランスジェニック動物を使用して、トランス遺伝子を保持するさらなる動物を繁殖させることができる。さらには、トランス遺伝子を保持しているトランスジェニック動物を、他のトランス遺伝子を保持している他のトランスジェニック動物と更に交雑させることができる。

30

【0106】

相同組み換え動物を作出することを目的として、欠失、付加、または置換が導入され、それによって遺伝子が増加 (例えば、機能的に破壊) した、本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする遺伝子の少なくとも一部を含む、ベクターが調製される。別の実施の形態では、ベクターは、相同組み換えの際に、内在性の遺伝子が機能的に破壊されるように設計される (すなわち、もはや機能的なタンパク質をコードしない; 「ノックアウト」ベクターとも称される)。あるいは、ベクターは、相同組み換えの際に、内在性遺伝子が増加または別の方法で変化してもなお、機能的なタンパク質をコードするように設計することができる (例えば、上流調節領域が増加することによって内在性タンパク質の発現を増加させることができる)。相同組み換えベクターでは、遺伝子の変化部分が、該遺伝子の追加の核酸によって5'および3'末端に隣接して配置され、ベクターが担持する外来遺伝子と胚幹細胞中の内在性遺伝子との間に相同組み換えを生じさせる。追加のランニング核酸配列は、内在性の遺伝子との相同組み換えを成功させるのに十分な長さを有す

40

50

る。典型的には、数キロベースのフランキングDNA（5'および3'末端の両方）がベクターに含まれる（例えば、相同組み換えベクターについて記載されるThomas and Capecchi, 1987, Cell 51:503を参照）。ベクターは胚幹細胞株（例えば、エレクトロポレーションによって）に導入され、ここで、導入された遺伝子が内在性の遺伝子と相同組み換えを起こした細胞が選択される（例えば、Li et al., 1992, Cell 69:915を参照）。選択された細胞は、次に動物（例えば、マウス）の胚盤胞に注入され、凝集キメラを形成する（例えば、Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, Ed., IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152を参照）。次に、キメラ胚は、適切な偽妊娠雌性里親動物に移植され、前記胚が出産に至る。生殖細胞内に相同組み換えDNAを保持する子孫を使用して、トランス遺伝子の生殖細胞系への伝達により、動物の全ての細胞が相同組み換えDNAを含んでいる動物を繁殖させることができる。相同組み換えベクターおよび相同組み換え動物を構築する方法はさらに、Bradley (1991) Current Opinion in Bio/Technology 2:823-829および国際出願公開第WO90/11354号パンフレット（参照することにより組み込まれる）、同第WO91/01140号パンフレット（参照することにより組み込まれる）、同第WO92/0968号パンフレット（参照することにより組み込まれる）、および同第WO93/04169号パンフレット（参照することにより組み込まれる）にも記載されている。

10

【0107】

別の実施の形態では、トランス遺伝子の調節発現を可能にする選択されたシステムを含む、トランスジェニック非ヒト動物を作出することができる。このようなシステムの1つの例は、バクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼシステムである。cre/loxPリコンビナーゼシステムの説明は、例えば、Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236を参照されたい。リコンビナーゼシステムの別の例は、サッカロミセス・セレピシエのFLPリコンビナーゼシステムである（O'Gorman et al., 1991, Science 251:1351-1355）。cre/loxPリコンビナーゼシステムを使用してトランス遺伝子の発現を調節する場合には、Creリコンビナーゼと選択されたタンパク質の両方をコードするトランス遺伝子を含む動物が必要である。このような動物は、例えば、一方は選択されたタンパク質をコードするトランス遺伝子を含み、他方はリコンビナーゼをコードするトランス遺伝子を含んだ、2種類のトランスジェニック動物を交配させることによる、「ダブル」トランスジェニック動物の構築により提供することができる。

20

30

【0108】

本明細書に記載される非ヒト・トランスジェニック動物のクローンは、例えば、Wilmut et al. (1997) Nature 385:810-813および国際出願公開第WO97/07668号パンフレット（参照することにより組み込まれる）およびWO97/07669号パンフレット（参照することにより組み込まれる）に記載の方法に従って作出することができる。

【0109】

V. 典型的なキット

キットは、少なくとも1種類の試薬、例えば、本発明のマーカースペシフィックに検出するためのプローブを含む、いずれかの製品（例えば、パッケージまたは容器）であり、前記製品は、本発明の方法を実施するためのユニットとして、宣伝、流通、または販売される。本発明の組成物、キット、および方法を用いて本発明の方法を実施する場合、本発明のALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカースペシフィック）は、対応するステージ、悪性度、組織型、または良性/前癌性/悪性の性質を有する癌を患っている被験体の少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%または100%に、陽性結果が得られるように選択されうる。ある特定の実施の形態では、本発明のマーカースペシフィックまたはマーカースペシフィック群は、母集団について約10%を超えるPPV（陽性予測値）が得られるように選択されうる（例えば、99.5%を超えるアッセイ特異性に加えて）。

40

【0110】

50

本発明の複数の A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ―）が本発明の組成物、キット、および方法に用いられる場合、各マーカ―の量、構造、および/または活性、または発現またはコピー数のレベルは、単一反応混合物中（すなわち、各マーカ―について異なる蛍光プローブなどの試薬を使用）または、1 つ以上の A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ―）に対応する個別の反応混合物中における、複数のマーカ―のそれぞれの正常な量、構造、および/または活性、もしくは、同一タイプの非癌性サンプルにおける発現レベルまたはコピー数と比較することができる。複数の A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ―）が用いられる場合には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上の個別のマーカ―が使用または同定されうる。

10

【0111】

本発明は、サンプル（例えば、アーカイブされた組織サンプルまたは被験体から採取したサンプル）における癌細胞をアッセイするための組成物、キット、および方法を含む。これらの組成物、キット、および方法は、必要に応じて、その組成物、キット、および方法がある特定のタイプのサンプルと一緒に使用するために適合させるほかは、上述のものと実質的に同一である。

【0112】

よって、本発明は、A L K 阻害剤に対する反応性が低減した、または低減する可能性のある、癌細胞の存在を評価するためのキットを含む（例えば、被験体サンプルなどのサンプル）。キットは、例えば、本発明の A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ―）に対応する核酸またはポリペプチドに特異的に結合するなど、本発明の A L K 遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表 1 記載のマーカ―）を同定することができる 1 つ以上の試薬を含みうる。本発明のマーカ―に対応するポリペプチドとの結合に適した試薬としては、抗体、抗体誘導体、抗体フラグメントなどが挙げられる。核酸（例えば、ゲノム DNA、mRNA、スプライシングされた mRNA、cDNA など）との結合に適した試薬としては、相補的核酸が挙げられる。例えば、核酸試薬は、基質、基質と結合しない標識化オリゴヌクレオチド、PCR プライマー対、分子指標プローブなどに固定されたオリゴヌクレオチド（標識化または非標識化）を含みうる。一部の実施の形態では、キットは、表 1 記載の変異を少なくとも 1 つ含む、少なくとも 1 本（one stretch）の核酸を取り囲む複数本（stretches）の核酸を認識し、ハイブリッド形成する少なくとも一対のプライマーを含むなど、本明細書に記載の方法の実施に有用な試薬、および、前記変異の存在の有無に関して増幅標的核酸を検出する手段を含みうる。

20

30

【0113】

本発明のキットには、随意的に、本発明の方法の実施に有用な追加の要素を含めてもよい。例えば、キットは、相補的核酸のアニーリングに適した、または抗体とその抗体が特異的に結合するタンパク質との結合に適した流体（例えば、SSC 緩衝剤）、1 つ以上の試料コンパートメント、本発明の方法の性能を説明する教材、正常細胞サンプル、癌細胞サンプルなどを含みうる。

【0114】

本発明のキットは、マーカ―のタンパク質レベルまたはタンパク質活性を決定するのに有用な試薬を含みうる。別の実施の形態では、本発明のキットには、マーカ―のメチル化状態を決定するための試薬を含めて差し支えなく、あるいは、マーカ―の構造変化、例えば、変異の存在を判定するための試薬を含めてもよい。

40

【0115】

VI. 予測医学

本発明はまた、個人を予防治療するために、診断分析、薬理ゲノム学、および臨床試験のモニタリングを予測目的で用いる、予測医学の分野も対象とする。したがって、本発明の 1 つの態様は、癌を有するまたは癌を発現するリスクのある個人が A L K 阻害剤介在性の治療に反応を示す可能性の高さを判定することを目的とした、本発明の 1 つ以上のマーカ―に対応するポリペプチドまたは核酸の量、構造、および/または活性を決定するため

50

のアッセイに関する。

【0116】

したがって、1つの態様では、本発明は、癌を有する被験体が、ALK阻害剤を用いた治療に反応を示す可能性の高さを判定する方法にも関連する。別の態様では、本発明は、疾患の経時変化を予測する方法に関連する。さらに別の態様では、本方法は、疾患の経時変化における有意事象の可能性を予測する方法にも関連する。ある特定の実施の形態では、本方法は、ALK阻害剤を用いた治療に対する反応に関連する生体指標または生体指標の組合せ（例えば、ALK突然変異）を検出し、被験体がALK阻害剤を用いた治療に対し反応を示す可能性の高さを判定することを含む。

【0117】

一部の実施の形態では、本方法は、癌を有すると診断された、または癌を有する疑いがある（例えば、癌の症状を示す）患者から得られた生物学的組織サンプルの、ALK突然変異（例えば、表1に記載のものなど）を検出することを目的とした細胞遺伝学的スクリーニングに関する。

【0118】

スクリーニング法の結果およびその解釈は、ALK阻害剤（例えば、PF-02341066および/またはPDD）を用いた治療に対する患者の反応の予測となる。本発明によれば、ALK突然変異の存在は、ALK阻害剤（例えば、PF-02341066および/またはPDD）を用いた治療が、ALK突然変異を有しない患者の治療と比較して、癌細胞に対する強化された治療的有用性をもたらすことを示している。

【0119】

1つの実施の形態では、本発明の方法は、DNAサンプル、例えば患者から単離された細胞から入手した染色体サンプルなどの、例えば生殖細胞系および/または体細胞DNAを含むサンプルを、染色体異常（例えば、本明細書に記載のALK突然変異）に関連した染色体領域にあるゲノムDNAに特異的であり、かつストリンジентな条件下で前記ゲノムDNAとハイブリッド形成するポリヌクレオチドプローブと接触させて、患者の細胞における1つ以上の異常部分（例えば、変異）の存在または不存在を判定することを含む。前記分析の結果は、治療薬、特にALKを阻害する薬物（例えば、PF-02341066および/またはPDD）を用いた治療に対して患者に生じうる反応の予測となる。

【0120】

別の実施の形態では、経時変化は、患者の疾患の過程における有意事象同士の間を期間を決定することによって測定され、ここで、測定は、患者が長期の経時変化を有するか否かを予測する。別の実施の形態では、有意事象は、一次診断から死亡への進行である。別の実施の形態では、有意事象は、一次診断から転移性疾患への進行である。別の実施の形態では、有意事象は、一次診断から再発への進行である。別の実施の形態では、有意事象は、転移性疾患から死亡への進行である。別の実施の形態では、有意事象は、転移性疾患から再発への進行である。別の実施の形態では、有意事象は、再発から死亡への進行である。ある特定の実施の形態では、経時変化は、全生存率、無増悪期間および/またはRECISTまたは他の応答基準の使用に関して測定される。

【0121】

ある特定の実施の形態では、患者サンプルを少なくとも2つの患者サブグループに分けることによって、所定の比較基準（predetermined measure）が作られる。ある特定の実施の形態では、サブグループの数は2つであり、患者サンプルは、ALK突然変異を有する患者のサブグループと、ALK突然変異を有しないサブグループに分けられる。ある特定の実施の形態では、被験体におけるALK突然変異状態は、ALK突然変異を有する、または有しないサブグループのいずれかと比較される；患者がALK突然変異を有している場合、患者はALK阻害剤（例えば、PF-02341066および/またはPDD）に反応する可能性が低い、および/または、患者は長期の経時変化を有する可能性が高い。ある特定の実施の形態では、サブグループの数は3以上であり、限定はしないが、特定のALK突然変異と相関する、ALK阻害剤の予測有効性の層別化に応じて、3つのサブ

10

20

30

40

50

グループ、4つのサブグループ、5つのサブグループおよび6つのサブグループが含まれる。ある特定の実施の形態では、反応の可能性は、全生存率、無増悪期間および/またはRECIST基準の使用に関して測定される。ある特定の実施の形態では、ALK阻害剤は、PF-02341066および/またはPDDである。

【0122】

別の態様では、本発明は、ALK突然変異陽性癌を有する被験体が、ALK阻害剤（例えば、PF-02341066および/またはPDD）を用いた治療に反応を示す可能性が高いか否かおよび/または疾患の経時変化が長期にわたるか否かを判定する方法に関する。別の態様では、本発明は、ALK突然変異陽性癌を有する被験体における疾患の経時変化を予測する方法に関する。別の態様では、本発明は、ALK突然変異陽性癌を有する被験体の有意事象の可能性を予測する方法に関する。

10

【0123】

1. ALK突然変異の検出方法

ALK遺伝子変異および/または遺伝子産物（例えば、表1記載のマーカ）を評価する方法は、ハイブリダイゼーションに基づいたアッセイを含めて当業者に周知である。例えば、サンプル中のコード化核酸のコピー数を評価する1つの方法は、サザンブロット法に関する。サザンブロット法では、ゲノムDNA（典型的には、断片化され、電気泳動ゲル上で分離される）は、標的領域に特異的なプローブとハイブリッド形成される。標的領域用のプローブに由来するハイブリダイゼーションシグナルの強度と、正常なゲノムDNA（例えば、同一または関連する細胞、組織、臓器などの非増幅部分）の分析から得た対照プローブ信号との比較は、標的核酸の存在/不存在および相対コピー数の推定値を提供する。あるいは、ノーザンブロット法は、サンプル中のコード化核酸のコピー数の推定に用いられる。ノーザンブロット法では、mRNAは、標的領域に特異的なプローブとハイブリッド形成される。標的領域用のプローブから得たハイブリダイゼーションシグナルの強度と、正常なmRNA（例えば、同一または関連する細胞、組織、臓器などの非増幅部分）の分析から得られた対照プローブ信号との比較は、標的核酸の存在/不存在および相対コピー数の推定を提供する。

20

【0124】

コピー数を決定するための別の手段は、in situハイブリダイゼーションである（例えば、Angerer (1987) Meth. Enzymol 152: 649参照）。一般に、in situハイブリダイゼーションは、次のステップを含む：（1）分析を目的とした組織または生物学的構造の固定；（2）標的DNAのアクセシビリティを増大させ、非特異的結合を低減させることを目的とした生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理；（3）生物学的構造または組織中の核酸への核酸混合物のハイブリダイゼーション；（4）ハイブリダイゼーションにおける非結合核酸断片の除去を目的としたハイブリダイゼーション後の洗浄、および（5）ハイブリッド形成された核酸断片の検出。これらのステップのそれぞれで用いられた試薬および使用条件は、特定の用途に応じて変化する。

30

【0125】

典型的なハイブリダイゼーションに基づいたアッセイとしては、限定はしないが、サザンブロット法またはin situハイブリダイゼーション（例えば、FISH法およびFISH plus SKY法）などの伝統的な「直接プローブ」法、および、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、例えば、cDNAに基づく、またはオリゴヌクレオチドに基づくCGHなどの「比較プローブ」法が挙げられる。本方法は、幅広い構成に使用することができ、例えば、限定はしないが、基板（例えば、膜またはガラス）結合法またはアレイに基づいた手法が挙げられる。

40

【0126】

1つの態様では、FISH分析法が用いられる。細胞サンプルは、当技術分野で既知の適切な細胞遺伝学的試験法、例えばFISH法によって試験するため、当技術分野で周知の方法に従って患者から入手される。1つの実施の形態では、FISH法は、Vysis（商標）システム（Abbott Molecular社製）に従って実施することができ、前記製造業者

50

のプロトコルは、参照することによって本明細書に取り込まれる。

【0127】

プローブは、染色体の異なる部分に存在するDNA塩基配列に対して本質的に相補的なDNA断片を含むものが用いられる。本発明に従った有用なプローブ、およびプローブの標識化およびサンプルへのハイブリダイゼーションの例は、Vysis, Inc.社に付与された2つの米国特許：米国特許第5,491,224号明細書（参照することにより組み込まれる）およびBittnerらに付与された同第6,277,569号明細書（参照することにより組み込まれる）である。

【0128】

染色体プローブは、典型的には、約50～約10⁵ヌクレオチド長である。長いプローブは、典型的には、約100～約500ヌクレオチド長の小さい断片を含む。セントロメアDNAおよび遺伝子座特異的DNAとハイブリッド形成するプローブは、例えば、Vysis, Inc.社（米国イリノイ州ダウナーズグローブ所在）、Molecular Probes, Inc.社（米国オレゴン州ユージーン所在）またはCytoCell社（英国オックスフォードシャー所在）から市販されている。あるいは、プローブは、標準的な技法を通じて、染色体またはゲノムDNAから非商業的に調製することもできる。例えば、使用可能なDNA源としては、ゲノムDNA、クローン化DNA配列、宿主の正常な染色体組とともに1つの染色体（例えば、ヒト染色体）またはその一部を含む体細胞ハイブリッド、およびフローサイトメトリーまたは顕微解剖によって生成された染色体が挙げられる。対象領域は、クローニングを通じて、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を通じた部位特異的増幅によって単離

10

20

【0129】

用いられるプローブは、染色体異常がこの領域に存在するか否かを判定するために、染色体の特定部位とハイブリッド形成される。染色体異常の1つの型は欠失である。欠失は、1つ以上の完全染色体でありうるが、通常は、欠失は、1つ以上の染色体の一部の欠損に関係する。プローブに含まれる染色体の領域全体が細胞から欠失する場合、前記プローブの細胞由来のDNAへのハイブリダイゼーションは、通常は生じず、その染色体にはシグナルは存在しない。プローブ内に部分的に含まれる染色体領域が細胞から欠失される場合には、そのプローブの細胞由来のDNAへのハイブリダイゼーションは依然として生じるが、存在するシグナルはそれほど大きくはないであろう。例えば、シグナルの消失は、プローブ検出が意図する遺伝子異常部分を含まない、対照細胞に由来するDNAへのプローブハイブリダイゼーションと比較される。一部の実施の形態では、染色体異常の存在に関し、少なくとも1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、またはそれ以上の細胞が列挙される。

30

【0130】

検出する染色体異常としては、限定はしないが、非相互転座、染色体内の逆位、点変異s、欠失、遺伝子コピー数の変化、遺伝子発現量の変化、および生殖細胞系の変異が挙げられる。特に、染色体異常の型の1つは複製である。複製は、染色体全体であって差し支えないが、染色体全体より小さい領域であってもよい。プローブに含まれる染色体領域が細胞内で複製される場合には、そのプローブの細胞由来のDNAへのハイブリダイゼーションは、プローブに含まれる染色体領域に異常部分を有しない対照細胞に存在するシグナルの数と比較して、通常、少なくとも1つ追加のシグナルを生じる。ヒト染色体2p23またはそれらのオルソログ、またはALK遺伝子の2p23に転座を含む染色体領域またはそれらのオルソログを検出するプローブが用いられうるが、適切なプローブは当技術分野で周知である（例えば、Vysis, Inc.社（米国イリノイ州ダウナーズグローブ所在）から市販される）。

40

【0131】

50

染色体プローブは、ハイブリッドを形成する染色体領域が検出できるように標識化される。プローブは、典型的には、低波長/高エネルギーの光を吸収した後に蛍光を発する有機分子であるフルオロフォアを用いて、直接的に標識化される。フルオロフォアは、二次的な検出分子を使用せずにプローブを視覚化できるようにする。フルオロフォアをヌクレオチドに共有結合させた後、ニックトランスレーション、ランダムプライミング、およびPCRラベリングなどの標準的な技術を用いて、ヌクレオチドをプローブに直接導入することができる。あるいは、プローブ内のデオキシシチジンヌクレオチドは、リンカーを用いてアミノ基を転移させることができる。次に、フルオロフォアを、アミノ基転移させたデオキシシチジンヌクレオチドと共有結合させる。米国特許第5,491,224号明細書(参照することにより組み込まれる)を参照のこと。

10

【0132】

米国特許第5,491,224号明細書は、プローブ標識を、共有結合した蛍光標識を有する多くのシトシン残基として説明している。蛍光的に標識化されたシトシン塩基の数は、個別のその標識化されたDNA断片が、検出すべき染色体または染色体領域に対する特異的な相補的結合(ハイブリダイジング)特性を実質的に保持すると同時に、検出可能な蛍光シグナルを作出するのに十分である。これらのプローブは、標識化されていないDNAプローブ・セグメントを採取し、連結基を用いてセグメント内の多くのデオキシシチジンヌクレオチドをアミノ基転移させ、アミノ基転移したデオキシシチジン塩基の少なくとも一部に蛍光標識を共有結合させることによって作出される。

20

【0133】

プローブはまた、ニックトランスレーション、ランダムプライマー標識化またはPCRラベリングによっても標識化することができる。標識化は、蛍光(直接)またはハプテン(間接)-標識化ヌクレオチドのいずれかを用いて行われる。代表的な標識の非限定的な例としては、次のものが挙げられる: AMCA-6-dUTP、Cascade Blue-4-dUTP、フルオレセイン-12-dUTP、ローダミン-6-dUTP、Texas Red-6-dUTP、Cy3-6-dUTP、Cy5-dUTP、ビオチン(BIO)-11-dUTP、ジゴキシゲニン(DIG)-11-dUTPまたはジニトロフェニル(DNP)-11-dUTP。

30

【0134】

プローブは、ビオチンまたはジゴキシゲニンを用いて間接的に標識化することができ、あるいは、³²Pおよび³Hなどの放射性同位体を用いて標識化することもできるが、プローブの視覚化には二次的な検出分子またはその後の継続処理が必要とされる。例えば、ビオチンで標識化されたプローブは、検出可能なマーカーと共役したアビジンによって検出することができる。例えば、アビジンは、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素マーカーと共役させることができる。酵素マーカーは、酵素用の基質および/または触媒を用いて、標準的な比色反応で検出することができる。アルカリホスファターゼ用の触媒としては、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルフォスフェートおよびニトロ・ブルー・テトラゾリウムが挙げられる。ジアミノ安息香酸は、西洋ワサビペルオキシダーゼの触媒として使用することができる。

40

【0135】

プローブはまた、蛍光または他の標識が、ハイブリダイゼーションの前または間にDNAの一部とならず、ハイブリダイゼーション後に付加されて、染色体とハイブリッド形成したプローブを検出するように調製することができる。例えば、DNAに組み込まれた抗原性分子を有するプローブを用いることができる。ハイブリダイゼーションの後、これらの抗原性分子は、該抗原性分子と反応性の特異的な抗体を用いて検出される。これらの抗体は、それ自体が蛍光色素を取り込むことができ、あるいは、結合蛍光色素を有する第2の抗体を用いて検出することもできる。

【0136】

しかしながら、処理または修飾されたプローブDNAは、一般に、ハイブリダイゼーションに使用する前に未反応の残余生成物(例えば、DNAに取り込まれていない蛍光色素

50

分子)を除去するため、精製される。

【0137】

ハイブリダイゼーションの前に、染色体プローブは、当技術分野で周知の方法に従って変性される。一般に、ハイブリダイゼーションのステップは、標識化プローブ組成物に対するブロッキングDNAを過剰に加え、ハイブリダイゼーション条件下、例えばDNAを変性させたスライド上で、ブロック化プローブ組成物を検出すべき染色体領域と接触させ、ハイブリッド形成していないプローブを洗い流し、プローブ組成物と染色体または染色体領域との結合を検出することを含む。

【0138】

プローブは、ハイブリダイゼーション条件下で、染色体DNAとハイブリッド形成またはアニーリングされる。「ハイブリダイゼーション条件」とは、プローブと標的染色体DNAとの間のアニーリングを促進する条件である。異なるプローブのアニーリングは、プローブの長さ、塩基濃度などに応じて変化することから、アニーリングは、プローブ濃度、ハイブリダイゼーション温度、塩濃度および当技術分野で周知の他の因子を変化させることによって促進される。

10

【0139】

ハイブリダイゼーション条件は、濃度、塩基組成、複雑性、およびプローブの長さ、ならびに、塩濃度、温度、およびインキュベーションの長さを変化させることによって促進される。例えば、in situハイブリダイゼーションは、典型的には、1~2×SSC、50~65%のホルムアミドおよび非特異的ハイブリダイゼーションを抑制するブロッキングDNAを含むハイブリダイゼーション緩衝液中で行われる。一般に、上述のハイブリダイゼーション条件は、約25~約55の温度、および約0.5時間~約96時間のインキュベーション時間を含む

20

標的領域外での染色体プローブとDNAとの非特異的結合は、一連の洗浄によって除去することができる。各洗浄における塩の温度および濃度を変化させて、洗浄のストリンジェンシーを調節する。例えば、高ストリンジェンシー条件では、洗浄は、約65~約80で、0.2倍~約2倍のSSC、および約0.1%~約1%のNonidet P-40(NP40)などの非イオン性洗剤を使用して行うことができる。ストリンジェンシーは、洗浄温度を低下させることによって、または洗浄中の塩濃度を増大させることによって下げることができる。一部の用途では、反復配列のハイブリダイゼーション容量をブロックすることが必要である。よって、一部の実施の形態では、非特異的ハイブリダイゼーションのブロックにtRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-I DNAが用いられる。

30

【0140】

洗浄後、スライドから液体が流され、風乾され、次いでスライドに媒体が載せられ、DAPIなどの対比染色およびカバースリップがスライドに施用される。スライドはすぐに観察ことができ、あるいは、検査前に-20で保存することもできる。

【0141】

蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法に用いられる蛍光プローブでは、蛍光は、各フルオロフォアに適したフィルタを装備した蛍光顕微鏡を用いて、または複数のフルオロフォアを観察するためにデュアルまたはトリプルバンドパスフィルタのセットを使用することによって、視覚化することができる。例えば、米国特許第5,776,688号明細書(参照することにより組み込まれる)を参照。あるいは、フローサイトメトリーなどの技法を用いて、染色体プローブのハイブリダイゼーションパターンを検査することもできる。FISH法を用いて、染色体の領域の染色体のコピー数または再配列を検出することもできる。これらのプローブは蛍光タグで標識化されていることから、相補的DNAとハイブリッド形成または結合し、研究者による蛍光顕微鏡を使用したDNAの配列の位置の視認を可能にする。細胞の活発な分裂が必要とされる他の多くの染色体の研究に用いられる技法とは異なり、FISH法は、非分裂細胞上で行うこともでき、非常に多目的な手法である。したがって、FISH法は、間期細胞または細胞分裂周期の中期の細胞

40

50

を使用して行うことができる。FISH分析法に関する多くの技法は、GrayおよびPinkelによる米国特許第5,447,841号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載されている。

【0142】

FISH法の結果は、プローブが検出されるように設計された特異的な染色体異常を含まないことが知られている対照細胞を参照して解釈することができる。対照細胞由来のプローブ-DNA間のFISHハイブリダイゼーションパターンが、特異的な染色体異常について試験およびアッセイされる細胞に由来するDNAへの同一プローブのハイブリダイゼーションパターンと比較される。プローブが染色体または染色体領域の欠失を検出するように設計されている場合、試験細胞由来のDNAとのプローブのハイブリダイゼーションは、通常、対照細胞由来のものよりも少ない。通常、試験細胞にはプローブ信号は存在せず、プローブが通常ハイブリッド形成する染色体領域が、欠失していることを示す。プローブが染色体の複製または付加を検出するように設計されている場合、試験細胞由来のDNAとのプローブのハイブリダイゼーションは、通常、対照細胞のものよりも多く存在する。通常、試験細胞には追加のプローブ信号が存在し、プローブが通常ハイブリッド形成する染色体領域の追加の存在を表している。

10

【0143】

CGH法では、核酸の第1の採取物(例えば、腫瘍の可能性のあるサンプルなど、サンプルから入手)は第1の標識を用いて標識化され、一方、核酸の第2の採取物(例えば、健康な細胞/組織に由来するものなどの対照サンプルから入手)は、第2の標識を用いて標識化される。核酸のハイブリダイゼーションの比は、アレイ中の各ファイバーと結合する2つの(第1および第2)標識の比によって決定される。染色体の欠失または重複が存在する場合、2つの標識のシグナルの比の差異が検出され、その比はコピー数の測定尺度を提供する。アレイに基づくCGHはまた、単色標識化を行うこともできる(ハイブリダイゼーションの前に対照サンプルと腫瘍の可能性のあるサンプルを2つの異なる染料を用いて標識化し、それらを混合することとは対照的に、単色標識化では、アレイ上のプローブのハイブリダイゼーションの比較に起因して比率を得る)。単色CGH法では、対照を標識化して1つのアレイとハイブリッド形成し、アブソリュート信号を読み取り、また、腫瘍の可能性のあるサンプルを標識化して第2のアレイとハイブリッド形成し(同一の内容を使用)、アブソリュート信号を読み取る。2つのアレイから得たアブソリュート信号に基づいてコピー数の違いを計算する。本発明の方法とともに使用するのに適したハイブリダイゼーションプロトコルは、例えば、Albertson (1984) EMBO J. 3: 1227-1234; Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9138-9142; EPO Pub. No. 430,402; Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N.J. (1994)などに記載されている。1つの実施の形態では、Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20: 207-211、またはKallioniemi (1992) Proc. Natl Acad Sci USA 89:5321-5325 (1992)のハイブリダイゼーションプロトコルが用いられる。アレイに基づくCGHは、米国特許第6,455,258号明細書に記載されており、これらの各内容は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

20

30

【0144】

さらに別の実施の形態では、増幅に基づくアッセイを使用して、存在/不存おおよびコピー数を測定することができる。これらの増幅に基づくアッセイでは、核酸配列は、増幅反応(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR))におけるテンプレートとしての働きをする。定量的な増幅では、増幅産物の量は、元々のサンプルにおけるテンプレートの量に比例するであろう。例えば健康な組織などの適切な対照との比較は、コピー数の測定尺度を提供する。

40

【0145】

「定量的な」増幅方法は当業者に周知である。例えば、定量的PCRは、同一のプライマーを使用して、既知量の対照配列を同時に共増幅することを含む。これは、PCR反応を較正するために用いられうる内部標準を提供する。定量的PCRの詳細なプロトコルは

50

、Innis, et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N.Y.に提供されている。定量的PCR分析を用いたマイクロサテライト領域におけるDNAのコピー数の測定は、Ginzonger, et al. (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記載されている。遺伝子の既知の核酸配列は、当業者が遺伝子の任意の部分を増幅するためにプライマーを日常的に選択可能にするのに十分である。蛍光性の定量的PCRもまた、本発明の方法に使用することができる。蛍光性の定量的PCRでは、定量は、例えば、TaqManおよびサイバークリーン (sybr green) などの蛍光シグナルの量に基づく。

【0146】

他の適切な増幅法としては、限定はしないが、リガーゼ連鎖反応法 (LCR) (Wu and Wallace (1989) Genomics 4: 560, Landegren, et al. (1988) Science 241:1077、およびBarringer et al. (1990) Gene 89: 117参照)、転写増幅法 (Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173)、自家持続配列複製法 (Guatelli, et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87: 1874)、ドットPCR法、およびリンカー-アダプターPCR法などが挙げられる。

【0147】

ヘテロ接合性喪失 (LOH) マッピング (Wang, Z.C., et al. (2004) Cancer Res 64(1):64-71; Seymour, A. B., et al. (1994) Cancer Res 54, 2761-4; Hahn, S. A., et al. (1995) Cancer Res 55, 4670-5; Kimura, M., et al. (1996) Genes Chromosomes Cancer 17, 88-93) もまた、増幅領域または欠失領域の同定に使用して差し支えない。

【0148】

2. 遺伝子発現の評価方法

マーカーの発現量についても分析することができる。本発明のマーカーの発現は、転写分子またはタンパク質の発現を検出するための幅広い周知の方法で評価されうる。これらの方法の非限定的な例としては、分泌された、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質、または核タンパク質の検出用の免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質の機能または活性の分析法、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸の逆転写法、および核酸増幅法が挙げられる。

【0149】

ある特定の実施の形態では、特定の遺伝子の活性は、ある程度の遺伝子転写産物 (例えば、mRNA)、ある程度の翻訳されるタンパク質量、またはある程度の遺伝子産物活性によって特徴づけられる。マーカーの発現は、mRNAレベル、タンパク質レベル、またはタンパク質活性の検出を含めたさまざまな方法でモニタリングすることができ、これらは、標準的な技法を用いて測定することができる。検出は、遺伝子発現 (例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパク質、または酵素活性) のレベルの定量化に関するものであって差し支えなく、あるいは、特に対照レベルとの比較においては、検出は遺伝子発現レベルの定性的評価であってもよい。

【0150】

核酸ハイブリダイゼーション法を用いて遺伝子転写産物 (mRNAまたはそれらから作出されたcDNA) を検出および/または定量する方法は、当業者に周知である (上記Sambrook et al. の文献を参照)。例えば、cDNAの存在、不存在、または量を評価する方法の1つは、上述のサザン法に関する。簡潔に述べると、mRNAを単離し (例えば、酸性グアニジン・フェノール・クロロホルム抽出法を使用、上記Sambrook et al. の文献を参照)、逆転写させて、cDNAを産生する。次に、cDNAを随意的に分解し、緩衝剤中でゲル電気泳動にかけ、膜へと移送させる。次に、標的cDNAに特異的な核酸プローブを用いてハイブリダイゼーションが行われる。

【0151】

これら診断分析および予測分析の一般原理は、適切な条件下、マーカーとプローブが相互作用および結合するのに十分な時間、マーカーおよびプローブを含むサンプルまたは反応混合物を調製し、その後、取り出し可能なおよび/または反応混合物中で検出可能な複

10

20

30

40

50

合体を形成することを含む。これらの分析はさまざまな方法で行うことができる。

【0152】

例えば、このような分析を行うための方法の1つは、マーカーまたはプローブを、基板とも称される固相担体上にアンカーし、反応終了時に固相上にアンカーされた標的マーカー/プローブ複合体を検出することを含む。このような方法の1つの実施の形態では、マーカーの存在および/または濃度についてアッセイされるべき被験体由来のサンプルは、キャリアまたは固相担体上にアンカーすることができる。別の実施の形態では、逆の状態も可能であり、その場合、プローブが固相にアンカーされ、被験体由来のサンプルは分析のアンカー成分として反応することができる。

【0153】

アッセイ成分を固相にアンカーするための多くの確立された方法が存在する。これらには、限定はしないが、ビオチンとストレプトアビジンの共役を通じて固定化されたマーカー分子またはプローブ分子が含まれる。このようなビオチン化アッセイ成分は、当技術分野で既知の技術（例えば、ビオチン化キット、Pierce Chemicals社製（米国イリノイ州ロックフォード所在））を用いてビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）から調製することができ、ストレプトアビジンでコーティングした96ウェルプレート（Pierce Chemical社製）のウェル内で固定化することができる。ある特定の実施の形態では、固定化アッセイ成分を有する表面があらかじめ準備され、保管されうる。

【0154】

これらの分析のための他の適切なキャリアまたは固相担体には、マーカーまたはプローブが属する分子の類を結合することができるいずれかの材料が含まれる。周知の担体またはキャリアとしては、限定はしないが、ガラス、ポリスチレン、ナイロン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、アミラーゼ、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱が挙げられる。

【0155】

上記手法を用いてアッセイを行うために、非固定化成分が固相に加えられ、その際に第2の成分がアンカーされる。反応完了後、形成された複合体が固相上に固定化された状態で維持されるような条件下で、複合化していない成分が取り除かれうる（例えば、洗浄によって）。固相にアンカーされたマーカー/プローブ複合体の検出は、本明細書で説明した多くの方法で達成することができる。

【0156】

別の実施の形態では、プローブが、アンカーされたアッセイ成分の場合、該プローブは、アッセイの検出および読み出しの目的で、直接的または間接的に、本明細書で述べた当業者に周知の検出可能な標識を用いて標識化することができる。

【0157】

マーカー/プローブ複合体の形成は、いずれの成分も（マーカーまたはプローブ）さらなる操作または標識化することなく、例えば蛍光エネルギー移動によって（例えば、Lakowiczらの米国特許第5,631,169号明細書（参照することにより組み込まれる）；Stavrianopoulosらの米国特許第4,868,103号明細書（参照することにより組み込まれる）を参照）、直接的に検出することも可能である。第1の「ドナー」分子上のフルオロフォア標識は、適切な波長の入射光を用いた励起の際に、その放射蛍光エネルギーが第2の「アクセプター」分子上の蛍光標識によって吸収され、今度は蛍光標識が吸収エネルギーによって蛍光を発することができるようになるように選択される。あるいは、「ドナー」タンパク質分子は、単に、トリプトファン残基の自然の蛍光エネルギーを利用してよい。標識は「アクセプター」分子標識が「ドナー」のものと識別されるように、異なる光波長を放出するものが選択される。標識間のエネルギーの伝達効率は分子間の距離に関係していることから、分子間の空間関係が評価されうる。分子間に結合が生じる状況において、アッセイにおける「アクセプター」分子標識の蛍光放射は最大であるべきである。FET結合事象は、当技術分野で周知の標準的な蛍光検出手段（例えば、蛍光光度計

10

20

30

40

50

を使用)を通じて、便利に測定することができる。

【0158】

別の実施の形態では、プローブのマーカを認識する能力判定は、いずれかのアッセイ成分(プローブまたはマーカ)を標識化することなく、リアルタイム生体分子相互作用分析(BIA)などの技術を用いて達成することができる(例えば、Sjolander, S. and Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 and Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705参照)。本明細書では「BIA」または「表面プラズモン共鳴」とは、相互作用物質のいずれか(例えば、BIACore)を標識化することなく、生体特異的な相互作用をリアルタイムに研究するための技術である。結合表面における質量変化(結合事象を示す)は、表面近くでの光の屈折率の変化(表面プラズモン共鳴(SPR)の光学現象)を生じ、生体分子間のリアルタイムの反応を表すものとして用いることができる検出可能なシグナルをもたらす。

10

【0159】

あるいは、別の実施の形態では、液相中の溶質としてマーカおよびプローブを用いて、類似した診断分析および予測分析を行うことができる。このような分析では、複合体化したマーカとプローブは、限定はしないが、分画遠心法、クロマトグラフィー、電気泳動法および免疫沈降などの多くの標準的な技法のいずれかによって、非複合体化成分から分離される。分画遠心法では、マーカ/プローブ複合体は、異なる大きさおよび密度に基づいた複体の異なる沈降平衡に起因して、一連の遠心分離ステップを通じて非複合体化アッセイ成分から分離されうる(例えば、Rivas, G., and Minton, A.P., 1993, Trends Biochem Sci. 18(8):284-7参照)。標準的なクロマトグラフィー法も、複合体化した分子を非複合体化分子から分離するのに利用して差し支えない。例えば、ゲルろ過クロマトグラフィーは、大きさに基づいて、およびカラムフォーマットにおける適切なゲルろ過樹脂の利用を通じて、分子を分離し、例えば、比較的大きい複合体が比較的小さい非複合体化成分から分離されうる。同様に、非複合体化成分と比較して、マーカ/プローブ複合体の比較的不同なる電荷特性は、例えばイオン交換クロマトグラフィー樹脂の利用を通じて、複合体を非複合体化成分と区別するのに利用されうる。これらの樹脂およびクロマトグラフィー法は当業者に周知である(例えば、Heegaard, N.H., 1998, J. Mol. Recognit. Winter 11(1-6):141-8; Hage, D.S., and Tweed, S.A. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 1997 Oct 10;699(1-2):499-525参照)。ゲル電気泳動法もまた、複合体化したアッセイ成分を非結合性成分から分離するのに利用されうる(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1987-1999参照)。この方法では、タンパク質または核酸複合体は、例えば、大きさまたは電荷に基づいて分離される。電気泳動工程の間に結合相互作用を維持するためには、非変性のゲルマトリクス材料、および、還元剤不存在の条件が典型的である。特定の分析およびその成分にとって適切な条件は、当業者に周知であろう。

20

30

【0160】

特定の実施の形態では、マーカに対応するmRNAレベルは、当技術分野で既知の方法を用いて、生体サンプルにおけるin situフォーマットおよびインビトロフォーマットの両方によって決定することができる。「生体サンプル」という用語は、被験体から単離された組織、細胞、生体液およびそれらの単離物、ならびに、被験体内に存在する組織、細胞および流体を含むことが意図されている。多くの発現検出方法は、単離RNAを使用する。インビトロの方法では、mRNAの単離を選択しないRNA単離法は、細胞からのRNAの精製のために利用することができる(例えば、Ausubel et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York 1987-1999参照)。加えて、例えば、ChomczynskiのシングルステップのRNA単離法(1989年、米国特許第4,843,155号明細書参照(参照することにより組み込まれる))などの当業者に周知の方法を用いて、多数の組織サンプルを容易に処理することができる。

40

【0161】

単離された核酸は、限定はしないが、サザン法またはノーザン分析法、ポリメラーゼ連

50

鎖反応分析およびプローブアレイを含めた、ハイブリダイゼーション分析または増幅分析に使用することができる。mRNAレベルを検出するための診断法の1つは、単離されたmRNAを、検出すべき遺伝子によってコードされたmRNAとハイブリッド形成することができる核酸分子(プローブ)に接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、完全長cDNA、またはそれらの一部であって差し支えなく、例えば、少なくとも7、15、30、50、100、250または500ヌクレオチド長であって、ストリンジェントな条件下で、本発明のマーカをコードするmRNAまたはゲノムDNAと特異的にハイブリッド形成するオリゴヌクレオチドなどが挙げられる。本発明の診断分析に使用する他の適切なプローブは本明細書に記載されている。プローブを用いたmRNAのハイブリダイゼーションは、対象マーカが発現されていることを示唆する。

10

【0162】

1つのフォーマットでは、mRNAを固体表面に固定化し、プローブと接触させる；これは、例えば、単離mRNAをアガロース・ゲル上で電気泳動を行い、mRNAをゲルからニトロセルロースなどの膜に移送することなどによる。別のフォーマットでは、プローブが固体表面に固定化され、例えば、アフィメトリクス社のDNAチップアレイにおいて、mRNAがプローブと接触する。当業者は、本発明のマーカによってコードされたmRNAのレベルの検出に使用するために、既知のmRNAの検出方法を容易に適合させることができる。

【0163】

プローブは、タンパク質をコードする核酸配列の完全長であっても、あるいは完全長未満であってもよい。短いプローブは、特異性について経験的に試験される。典型的な核酸プローブは20塩基またはそれ以上の長さである(例えば、Sambrookらの核酸ハイブリダイゼーションに使用する核酸プローブ配列を選択する方法を参照)。ハイブリッド形成した部分の視覚化は、cDNAの存在または不存在の定性的な決定を可能にする。

20

【0164】

サンプル中の本発明のマーカに対応する転写産物レベルを決定する別の方法は、例えば、rtPCR(Mullis, 1987年, 米国特許第4,683,202号明細書(参照することにより組み込まれる)に記載される実験的实施形態)、リガーゼ連鎖反応(Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189-193)、自家持続配列複製法(Guatelli et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwoh et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardi et al., 1988, Bio/Technology 6:1197)、ローリング・サークル複製(Lizardiら, 米国特許第5,854,033号明細書(参照することにより組み込まれる))または他の核酸増幅法のいずれかによる核酸増幅法を含み、当業者に周知の方法を使用して、増幅分子を検出する。蛍光性のrtPCRもまた、本発明の方法に使用されうる。蛍光性rtPCRでは、定量は、例えば、TaqManおよびサイバグリーン(sybr green)などの蛍光シグナルの量に基づいている。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少数しか存在しない場合には、これらの分子の検出に特に有用である。本明細書では、増幅プライマーは、遺伝子の5'または3'領域をアニールすることができ、その間に短い領域を含んだ、一对の核酸分子(それぞれ、プラス鎖およびマイナス鎖であるか、またはその逆)であると定義される。一般に、増幅プライマーは、約10~30ヌクレオチド長であり、約50~200ヌクレオチド長の領域に隣接する。適切な条件下および適切な試薬を用いて、このようなプライマーは、該プライマーを側面に有するヌクレオチド配列を含む核酸分子の増幅を可能にする。

30

40

【0165】

in situの方法では、検出の前に細胞からmRNAを単離する必要がない。このような方法では、細胞または組織サンプルは、既知の組織学的方法を用いて調製/処理される。つぎに、そのサンプルを担体(典型的にはスライドガラス)上に固定化し、次いで、マーカをコードするmRNAとハイブリッド形成することができるプローブに接触させる。

【0166】

50

マーカーの絶対発現量に基づいた決定方法の代わりに、決定は、マーカーの正規化発現量に基づいてもよい。発現量の正規化は、マーカーの絶対発現量を、例えば、構成的に発現されるハウスキーピング遺伝子などのマーカーではない遺伝子の発現と比較することによって、補正することによりなされる。正規化に適した遺伝子としては、アクチン遺伝子、または上皮細胞特異的遺伝子などのハウスキーピング遺伝子が挙げられる。この正規化により、例えば被験体サンプルなどの1つのサンプルにおける発現量と例えば非癌性のサンプルなどの別のサンプルとの比較、または発生源の異なるサンプル間の比較が可能になる。

【0167】

あるいは、発現量は、相対発現量としてもたらされてもよい。マーカーの相対発現量を決定するため、対象サンプルの発現量の決定前に、癌細胞単離物との比較用の正常細胞の10以上、または50以上のサンプルについて、マーカーの発現レベルが決定される。多数のサンプルにおいてアッセイされた遺伝子の各々の平均発現量が決定され、これがマーカーのベースラインとなる発現量として用いられる。試験サンプルについて決定したマーカーの発現量(絶対的な発現レベル)を、次に、そのマーカーについて得られる平均発現値で割る。こうして相対発現量をもたらされる。

10

【0168】

ある特定の実施の形態では、ベースライン決定に用いられるサンプルは、同一の組織型の癌細胞または正常細胞に由来する。細胞源の選択は、相対発現量の使用に応じて決まる。平均発現スコアとして、正常組織に見られる発現を利用することは、アッセイするマーカーが、その細胞由来の組織に特異的であるか否か(正常細胞と比較して)を立証するのに役立つ。加えて、さらなるデータが蓄積されることから、平均発現値を修正することができ、蓄積データに基づく相対発現値の改善をもたらさう。正常細胞から得た発現データは、癌の状態を重症度によって分類するための手段を提供する。

20

【0169】

別の実施の形態では、マーカーの発現は、被験体サンプル中の細胞からゲノムDNAまたはmRNA/cDNA(すなわち、転写ポリヌクレオチド)を調製することによって、および、ゲノムDNAまたはmRNA/cDNAを、マーカーを含むポリヌクレオチド相補体およびそれらの断片である参照ポリヌクレオチドとハイブリダイゼーションすることによって、評価される。cDNAは、参照ポリヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションの前に、さまざまなポリメラーゼ連鎖反応方法のいずれかを用いて随意的に増幅されう。1つ以上のマーカーの発現は、同様に、マーカーの発現レベルを評価するため、定量的PCR(QPCR)を用いて検出されう。あるいは、本発明のマーカーの変異または変異体(例えば、単一ヌクレオチド多型、欠失)の検出のための多くの既知の方法のいずれかが、被験体における突然変異マーカーの発生の検出に用いられう。

30

【0170】

関連する実施の形態では、サンプルから得られた転写ポリヌクレオチドの混合物は、本発明のマーカーの少なくとも一部(例えば、少なくとも7、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも500、またはそれ以上のヌクレオチド残基)に対して相補的な、またはそれらと相同の、ポリヌクレオチドが固定された基板と接触させられる。本発明のマーカーに対して相補的、またはそれらと相同であるポリヌクレオチドが、基板上で特異的に検出可能な(例えば、異なる発色団またはフルオロフォアを用いて検出可能な、または異なる選択部分に固定される)場合、複数のマーカーの発現レベルは、単一の基板(例えば、選択された位置に固定されたポリヌクレオチドの「DNAチップ」マイクロアレイ)を利用して、同時に評価することができる。マーカーの発現の評価方法が、1つの核酸を別の核酸にハイブリダイゼーションすることに関するものを使用する場合、そのハイブリダイゼーションは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で行われう。

40

【0171】

50

別の実施の形態では、マーカーの発現を評価することを目的とした複数の方法の組合せが用いられる。

【0172】

本発明の組成物、キット、および方法は、本発明の1つ以上のマーカーの発現量またはコピー数における差異の検出に依拠していることから、ある特定の実施の形態では、マーカーの発現レベルまたはコピー数は、少なくとも1つの正常細胞および癌性細胞における発現またはコピー数の評価に用いられる方法の最小検出限界よりも有意に大きい。

【0173】

3. 発現タンパク質の評価法

マーカータンパク質の活性またはレベルもまた、発現ポリペプチドの検出または定量によって検出および/または定量することができる。ポリペプチドは、当業者に周知の多くの手段のいずれかによって検出または定量することができる。これらには、電気泳動法、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、高拡散クロマトグラフィーなどの生化学的分析方法、または、流体またはゲル沈降素反応、免疫拡散法（一元または二元）、免疫電気泳動法、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、免疫蛍光分析、ウエスタンブロット法、免疫組織化学的方法などのさまざまな免疫学的方法が含まれる。当業者は、細胞が本発明のマーカーを発現するか否かの判定に使用するため、既知のタンパク質/抗体検出方法を容易に適合させることができる。

【0174】

本発明のポリペプチドを検出するための別の薬剤は、例えば、検出可能な標識を有する抗体など、本発明のマーカーに対応するポリペプチドに結合することができる抗体である。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体でありうる。インタクト抗体またはそれらの断片（例えば、FabまたはF(ab')₂）を用いて差し支えない。プローブまたは抗体に関して「標識化」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリング（すなわち物理的に連結）することによるプローブまたは抗体の直接標識化、ならびに、直接標識化された別の試薬と反応させることによるプローブまたは抗体の間接標識化を含むことが意図されている。間接標識化の例としては、蛍光標識化された二次抗体を用いた一次抗体の検出および、蛍光標識化ストレプトアビジンを用いた検出ができるようにビオチンを使用したDNAプローブの末端標識化が挙げられる。

【0175】

別の実施の形態では、抗体は、例えば、放射標識化抗体、発色団標識化抗体、フルオロフォア標識化抗体、または酵素標識化抗体など、標識化される。別の実施の形態では、抗体誘導体（例えば、基板と共役した抗体、または、タンパク質-リガンド対{例えば、ビオチン-ストレプトアビジン}のタンパク質またはリガンドと共役した抗体）、もしくは、マーカーに対応するオープンリーディングフレームによってコードされたタンパク質、または、その正常な翻訳後修飾の全部または一部を受けたタンパク質など、マーカーに対応するタンパク質と特異的に結合する抗体フラグメント（例えば、一本鎖抗体、単離抗体の超可変領域など）が用いられる。

【0176】

免疫組織化学またはIHCとは、生物学的組織における抗原に特異的に結合する抗体の原理を利用した、組織切片の細胞における抗原（例えばタンパク質）の局所化のプロセスのことを表す。免疫組織化学的染色は、癌性腫瘍に見られるものなど、異常細胞の診断に幅広く用いられる。特異的な分子マーカーは、増殖または細胞死（アポトーシス）などの特定の細胞的事象の特徴である。IHCはまた、生物学的組織の異なる部分における生体指標および特異的に発現したタンパク質の分布および局在化を理解するための研究にも幅広く用いられる。抗体-抗原間の相互作用の視覚化は、多くの方法で達成される。最も一般的な例では、抗体は、発色反応（colour-producing reaction）を触媒することができるペルオキシダーゼなどの酵素に共役する。あるいは、抗体は、フルオレセイン、ローダミン、DyLight FluorまたはAlexa Fluorなどのフルオロフォアにタグ化されてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 7 7 】

細胞由来のタンパク質は、当業者に周知の技法を用いて単離することができる。用いられるタンパク質の単離方法は、例えば、HarlowおよびLaneによって報告されるものなどでありうる (Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。

【 0 1 7 8 】

1つのフォーマットでは、抗体または抗体フラグメントは、発現タンパク質を検出するために、ウエスタンブロットまたは免疫蛍光法などの方法に使用されうる。このような用途では、抗体またはタンパク質のいずれかを固体担体上に固定してもよい。適切な固相担体またはキャリアには、抗原または抗体を結合する能力のある担体が含まれる。周知の担体またはキャリアとしては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および改質セルロース、ポリアクリルアミド、斑糲岩、および磁鉄鉱などが挙げられる。

10

【 0 1 7 9 】

当業者は、抗体または抗原を結合するための多くの他の既知の適切なキャリアを知っており、本発明とともに使用するためにこのような担体を適合させることができる。例えば、細胞から単離されたタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけられ、ニトロセルロースなどの固相担体上に固定されうる。担体は、次に、適切な緩衝剤で洗浄され、その後、検出可能な標識化抗体を用いて処理されうる。次いで、固相担体は、非結合抗体を除去するために、第2の時間、緩衝剤を用いて洗浄されうる。次に、固体担体上の結合標識の量は、従来手段によって検出されうる。電気泳動法を使用してタンパク質を検出する方法は、当業者に周知である (一般に、R. Scopes (1982) *Protein Purification*, Springer-Verlag, N.Y.; Deutscher, (1990) *Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification*, Academic Press, Inc., N.Y.を参照)。

20

【 0 1 8 0 】

別の実施の形態では、サンプル中のポリペプチドの存在を検出および定量するために、ウエスタンブロット (イムノブロット) 法が用いられる。この技法は、一般に、サンプルタンパク質を、分子量に基づいてゲル電気泳動法によって分離し、分離タンパク質を適切な固体担体 (ニトロセルロースフィルタ、ナイロンフィルタ、または誘導体化ナイロンフィルタ) に移送し、ポリペプチドを特異的に結合する抗体とともにサンプルをインキュベーションすることを含む。抗ポリペプチド抗体は、固体担体上のポリペプチドに特異的に結合する。これらの抗体は、直接的に標識化されて差し支えなく、あるいは、抗ポリペプチドに特異的に結合する標識化抗体 (例えば、標識化ヒツジ抗ヒト抗体) を使用して、その後を検出されてもよい。

30

【 0 1 8 1 】

別の実施の形態では、ポリペプチドは、免疫測定法を用いて検出される。本明細書では、免疫測定法は、検体に特異的に結合する抗体を使用するアッセイである。よって、検体を単離し、標的とし、定量するための他の物理的または化学的特性の使用とは対照的に、免疫測定法は、ポリペプチドの抗抗体への特異的な結合を検出することによって特徴づけられる。

40

【 0 1 8 2 】

ポリペプチドは、多くのよく認識された免疫結合法 (immunological binding assays) のいずれかを使用して検出および/または定量化される (例えば、米国特許第4,366,241号明細書 (参照することにより組み込まれる); 同第4,376,110号明細書 (参照することにより組み込まれる); 同第4,517,288号明細書 (参照することにより組み込まれる); および同第4,837,168号明細書 (参照することにより組み込まれる) を参照)。一般的な免疫測定法の説明として、Asai (1993) *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology 7th Edition* も参照されたい。

【 0 1 8 3 】

50

免疫結合法（または免疫測定法）は、典型的には、検体（ポリペプチドまたはサブ配列）に特異的に結合し、多くの場合、前記検体を固定するため、「捕捉剤」を使用する。捕捉剤は、検体に特異的に結合する部分である。別の実施の形態では、捕捉剤は、ポリペプチドを特異的に結合する抗体である。抗体（抗ペプチド）は、当業者に周知の多くの手段のいずれかによって産生されうる。

【0184】

免疫測定法はまた、多くの場合、捕捉剤と検体によって形成される結合複合体に特異的に結合し、標識する、標識化剤も使用する。標識化剤は、それ自体が抗体／検体複合体を含む部分の1つでありうる。よって、標識化剤は、標識化ポリペプチドまたは標識化抗体でありうる。あるいは、標識化剤は、抗体／ポリペプチド複合体に特異的に結合する、別の抗体などの第3の部分でありうる。

10

【0185】

1つの実施の形態では、標識化剤は、標識を持つ第2のヒト抗体である。あるいは、前記第2の抗体は標識を欠いていてもよいが、同様に、第2の抗体が由来する種類の抗体に特異的な、標識化された第3の抗体によって結合されうる。第2の抗体は、酵素 - 標識化ストレプトアビジンなど、第3の標識化分子が特異的に結合することができる、例えばビオチンなどの検出可能な部分を有するように改質されうる。

【0186】

プロテインAまたはプロテインGなどの免疫グロブリン定常領域を特異的に結合することができる他のタンパク質もまた、標識化剤として使用して差し支えない。これらのタンパク質は、連鎖球菌の細胞壁の正常な構成物質である。それらは、さまざまな種に由来する免疫グロブリン定常領域との強い免疫原性の反応性を示す（一般に、Kronval, et al. (1973) J. Immunol., 111: 1401-1406, and Akerstrom (1985) J. Immunol., 135: 2589-2542を参照）。

20

【0187】

前述の通り、ポリペプチドの検出および／または定量化の免疫測定法は、当業者に周知の幅広いフォーマットを採用することができる。

【0188】

ポリペプチドを検出するための典型的な免疫測定法は、競合性または非競合性でありうる。非競合的免疫測定法は、捕捉された検体の量が直接的に測定されるアッセイである。1つの「サンドイッチ」アッセイでは、例えば、捕捉剤（抗ペプチド抗体）は、それらが固定化される固体基板に直接的に結合されうる。これらの固定化した抗体は、次に、試験サンプル中に存在するポリペプチドを捕捉する。固定化ポリペプチドは、次に、標識を持つ第2のヒト抗体などの標識化剤によって結合される。

30

【0189】

競合的アッセイでは、サンプル中に存在する検体（ポリペプチド）の量は、サンプル中に存在する検体によって捕捉剤（抗ペプチド抗体）から追い出された（または競合により排除された）添加（外来性）検体（ポリペプチド）の量を測定することによって、間接的に測定される。1つの競合的アッセイでは、既知量の（この場合には）ポリペプチドが、サンプルに加えられ、つぎに、そのサンプルは、捕捉剤と接触させられる。抗体に結合するポリペプチドの量は、サンプル中に存在するポリペプチドの濃度に逆比例する。

40

【0190】

別の実施の形態では、抗体は固体基板上に固定化される。抗体に結合したポリペプチドの量は、ポリペプチド／抗体複合体に存在するポリペプチドの量を測定することによって、あるいは、残留する非複合体化ポリペプチドの量を測定することによって、のいずれかで決定されうる。ポリペプチドの量は、標識化ポリペプチドを提供することによって検出されうる。

【0191】

本明細書に記載されるアッセイは、当業者に周知の標準的な方法に従って（ポリペプチドの陽性または陰性または定量化として）スコアリングされる。スコアリングの特定の方

50

法は、標識のアクセイフォーマットおよび選択に応じて決まる。例えば、ウエスタンプロット法は、酵素標識によって産生された着色生成物を視覚化することによってスコアリングすることができる。正確な分子量において明確に視認できる着色帯または着色点は陽性結果としてスコアリングされ、明確に視認できる点または帯がない場合は陰性結果としてスコアリングされる。前記帯または点の強度は、ポリペプチドの定量的測定を提供できる。

【0192】

本明細書に記載のさまざまな免疫測定法に使用するための抗体は、本明細書に記載されるように産生することができる。

【0193】

別の実施の形態では、レベル（活性）は、遺伝子産物の酵素活性を測定することによってアクセイされる。酵素活性のアクセイ方法は、当業者に周知である。

【0194】

マーカータンパク質検出のためのインピボの方法は、タンパク質に対する標識化抗体を被験体に導入することを含む。例えば、抗体は、被験体におけるその存在および位置を標準的な画像技術によって検出することができる、放射性マーカーを用いて標識化することができる。

【0195】

本発明の方法によって同定されたある特定のマーカーは、分泌タンパク質でありうる。特定のマーカータンパク質が分泌タンパク質であるか否かを判定することは、当業者にとって簡単な事柄である。この判定をするために、マーカータンパク質は、例えば、哺乳動物細胞、例えば、ヒト細胞株などにおいて発現し、細胞外液が回収され、細胞外液におけるタンパク質の存在または不存在が（例えば、タンパク質と特異的に結合する標識化抗体を使用して）評価される。

【0196】

以下は、タンパク質の分泌の検出に使用されうる方法の例である。約 8×10^5 の 293 T 細胞は、約 60 ~ 70 % のコンフルエンスに達するまで、5 % (v/v) CO_2 、95 % の空気雰囲気下、成長培地（10 % のウシ胎児血清を補充したダルベッコ変法イーグル培地 {DMEM}）を含むウェル内において、37 でインキュベーションされる。次に、細胞は、タンパク質をコードする発現ベクターを含む 2 マイクログラムの DNA、および 1 ウェルあたり 10 マイクロリットルの LipofectAMINE（商標）（GIBCO/BRL カタログ番号：18342-012）を含む標準的なトランスフェクション混合物を使用してトランスフェクトされる。トランスフェクション混合物は約 5 時間維持され、次いで新鮮な成長培地に置換され、空気雰囲気中で維持される。各ウェルは、メチオニンまたはシステインを含まない DMEM（DMEM-MC；ICN カタログ番号：16-424-54）を用いて、2 回穏やかにすすがれる。約 1 ミリリットルの DMEM-MC および約 50 マイクロキュリーのトランス- ^{35}S （商標）試薬（ICN カタログ番号：51006）が各ウェルに添加される。ウェルは、上述の 5 % の CO_2 雰囲気下で維持され、選択された期間、37 でインキュベーションされるインキュベーション後、150 マイクロリットルの馴化培地が除去され、遠心分離されて、浮遊細胞および残屑が除去される。上清におけるタンパク質の存在は、タンパク質が分泌されていることを示す。

【0197】

例えば、痰、気管支肺胞洗浄、胸水、組織、全血、血清、血漿、頬腔擦取物、唾液、脳脊髄液、尿、排泄物、および骨髄を含めたサンプルなど、被験体サンプルは、特に、細胞が癌性の場合、さらに具体的には、癌が転移している場合には、その中に細胞が含まれ、したがって、本発明の方法に用いられうるということが認識されよう。細胞サンプルは、当然ながら、サンプル中のマーカーの発現レベルを評価する前に、さまざまな周知の採取後の調製および保存技術（例えば、核酸および/またはタンパク質の抽出、固定、保存、凍結、限外ろ過、濃度、蒸発、遠心分離など）に供されて差し支えない。よって、本発明の組成物、キット、および方法は、タンパク質を発現する細胞の表面に提示された少なくとも 1

10

20

30

40

50

つの部分を有するタンパク質に対応するマーカーの発現の検出に用いることができる。特定のマーカーに対応するタンパク質が細胞表面タンパク質を含むか否かを判定することは、当業者にとって簡単なことである。例えば、免疫学的方法は、細胞全体におけるこのようなタンパク質の検出に用いて差し支えなく、または周知のコンピューターに基づいた配列分析法（例えば、S I G N A L Pプログラム；Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10:1-6）は、少なくとも1つの細胞外ドメイン（すなわち、分泌タンパク質と、少なくとも1つの細胞表面ドメインを有するタンパク質の両方を含む）の存在の予測に用いることができる。それを発現する細胞表面に提示された少なくとも1つの部分を有するタンパク質に対応するマーカーの発現は、必ずしも細胞を溶解させる必要なしに検出される（例えば、タンパク質の細胞表面ドメインと特異的に結合する標識化抗体を使用）。

10

【0198】

本発明はまた、生体サンプル、例えば、痰、気管支肺胞洗浄、胸水、組織、全血、血清、血漿、頬腔擦取物、唾液、脳脊髄液、尿、排泄物、および骨髓を含むサンプルにおいて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドまたは核酸の存在を検出するためのキットを含む。このようなキットは、被験体が癌を患っているか否か、あるいは、被験体の癌発現のリスクが増加しているか否かを判定するのに用いることができる。例えば、キットは、生体サンプル中のポリペプチドまたは本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードするmRNAを検出することができる標識化した化合物または薬剤、およびサンプル中のポリペプチドまたはmRNAの量を決定するための手段（例えば、ポリペプチドを結合する抗体、またはポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAに結合するオリゴヌクレオチドプローブ）を備えうる。キットはまた、キットを使用して得られる結果を解釈するための使用説明書も含みうる。

20

【0199】

抗体に基づくキットでは、前記キットは、例えば：（1）本発明のマーカーに対応するポリペプチドに結合する（例えば、固体担体に接着した）第1の抗体；および、随意的に、（2）ポリペプチドまたは第1の抗体のいずれかと結合し、検出可能な標識と共役する、第2の異なる抗体とを含みうる。

【0200】

オリゴヌクレオチドに基づくキットでは、前記キットは、例えば：（1）本発明のマーカーに対応するポリペプチドをコードする核酸配列とハイブリッド形成する、オリゴヌクレオチド、例えば、検出可能に標識化されたオリゴヌクレオチド、または（2）本発明のマーカーに対応する核酸分子を増幅するのに有用な一対のプライマーを含みうる。キットは、例えば、緩衝剤、保存剤、またはタンパク質安定剤も含みうる。キットは、検出可能な標識（例えば、酵素または基板）を検出するのに必要な成分をさらに含みうる。キットはまた、アッセイされ、試験サンプルと比較することができる、対照サンプルまたは一連の対照サンプルも含みうる。キットの各要素は個別の容器内に封入されて差し支えなく、さまざまな容器のすべては、キットを使用して行われるアッセイの結果を解釈するための使用説明書とともに、単一パッケージ内に存在しうる。

30

【0201】

4. 構造的変化の評価方法

本発明はまた、変化、例えば変異などの構造的変化の存在を評価する方法も提供する。

40

【0202】

別の検出方法は、多型部位と重なり合い、多型領域の周りに約5、約10、約20、約25、または約30ヌクレオチドを有するプローブを用いた、アレル特異的ハイブリダイゼーションである。本発明の別の実施の形態では、変異に特異的にハイブリダイゼーション可能な幾つかのプローブが、例えば「チップ」などの固相担体に接着される。オリゴヌクレオチドは、リソグラフィを含めたさまざまな方法によって固体担体に結合させることができる。例えば、チップは、250,000オリゴヌクレオチドまで保有することができる（GeneChip社製、アフィメトリクス（商標））。「DNAプローブアレイ」とも称されるオリゴヌクレオチドを含むこれらのチップを使用する変異検出分析は、例

50

えば、Cronin et al. (1996) Human Mutation 7:244に記載されている。1つの実施の形態では、チップは、遺伝子の少なくとも1つの多型領域の変異のすべてを含む。次に、固相担体を試験核酸と接触させ、特異的なプローブへのハイブリダイゼーションを検出する。したがって、1つ以上の遺伝子の多数の変異のアイデンティティを、単一のハイブリダイゼーション実験で同定することができる。例えば、5'上流調節要素におけるヌクレオチド多型の変異のアイデンティティを、単一のハイブリダイゼーション実験において決定することができる。

【0203】

他の検出方法では、変異を同定する前に、マーカーの少なくとも一部を最初に増幅する必要がある。増幅は、当技術分野で既知の方法に従って、例えば、PCRおよび/またはLCRによって行うことができる(Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560参照)。1つの実施の形態では、細胞のゲノムDNAは2つのPCRプライマーに曝露され、所望の量の増幅DNAの作出に十分な多くの周期で増幅される。ある特定の実施の形態では、2つのプライマーは、150~350塩基対の間に離れて位置している。

10

【0204】

別の増幅法としては、自家持続配列複製法(Guatelli, J.C. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅システム(Kwoh, D.Y. et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-レプリカーゼ(Lizardi, P.M. et al., (1988) Bio/Technology 6:1197)、および自家持続配列複製法(Guatelli et al., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:1874)、ならびに核酸に基づく配列増幅(NABSA)、または他のいずれかの核酸増幅法が挙げられ、続いて、当業者に周知の方法を用いて増幅分子が検出される。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数しか存在しない場合には、これらの分子の検出に特に有用である。

20

【0205】

1つの実施の形態では、当技術分野で既知のさまざまなシーケンシング反応のいずれかを用いて、マーカーの少なくとも一部を直接的に配列し、サンプルの配列を対応する参照(対照)配列と比較することによって変異を検出する。典型的なシーケンシング反応としては、MaxamおよびGilbert(Proc. Natl Acad Sci USA (1977) 74:560)またはSanger(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci 74:5463)によって開発された方法に基づくものが挙げられる。被験体のアッセイを行う場合には(Biotechniques (1995) 19:448)、質量分析による配列決定を含めたさまざまな自動配列決定手法のいずれかが使用されることもまた意図されている(例えば、H. Koesterによる「DNA Sequencing by Mass Spectrometry」という発明の名称の米国特許第5,547,835号明細書(参照することにより組み込まれる)および国際出願公開第WO94/16101号パンフレット(参照することにより組み込まれる);H. Koesterによる「DNA Sequencing by Mass Spectrometry Via Exonuclease Degradation」という発明の名称の米国特許第5,547,835号明細書(参照することにより組み込まれる)および国際出願公開第WO94/21822号パンフレット(参照することにより組み込まれる))、およびH. Koesterによる「DNA Diagnostics Based on Mass Spectrometry」という発明の名称の米国特許第5,605,798号明細書(参照することにより組み込まれる)および国際出願第PCT/US96/03651号明細書(参照することにより組み込まれる);Cohen et al. (1996) Adv Chromatogr 36:127-162; およびGriffin et al. (1993) Appl Biochem Biotechnol 38:147-159参照)。ある特定の実施の形態では、シーケンシング反応における決定には、わずかに1つ、2つまたは3つの核酸塩基の存在しか必要とされないことは、当業者にとって明白であろう。例えば1つのヌクレオチドのみが検出される、例えばAトラックなどを、行うことができる。

30

40

【0206】

さらに他の配列方法は、例えば、「Method of DNA sequencing employing a mixed DNA-polymer chain probe」という発明の名称の米国特許第5,580,732号明細書(参照することにより組み込まれる)および「Method for mismatch-directed in vitro D

50

NA sequencing」という発明の名称の米国特許第5,571,676号明細書(参照することにより組み込まれる)に開示されている。

【0207】

一部の事例では、被験体に由来するDNAにおけるマーカーの特異的アレルの存在は、制限酵素分析によって示すことができる。例えば、特異的なヌクレオチド多型は、別の変異のヌクレオチド配列を含まない制限酵素認識部位を含むヌクレオチド配列を生じうる。

【0208】

さらなる実施の形態では、開裂剤(ヌクレアーゼ、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムなど、およびピペリジンの使用)からの保護は、RNA/RNA、DNA/DNA、またはRNA/DNAのヘテロ二本鎖におけるミスマッチ塩基の検出に用いることができる(Myers, et al. (1985) Science 230:1242)。一般に、「ミスマッチ切断」の方法は、組織サンプルから入手した、例えばRNAまたはDNAなどのサンプル核酸とともにマーカー変異のヌクレオチド配列を含む、例えば、RNAまたはDNAなどの、随意的に標識化された、対照核酸をハイブリダイゼーションすることによって形成されるヘテロ二本鎖を提供することによって開始する。二本鎖は、対照とサンプル鎖の間の塩基対のミスマッチに基づいて形成された二本鎖など、二本鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理される。例えば、RNA/DNA二本鎖は、そのミスマッチ領域を酵素的に分解するために、RNaseで処理することができ、DNA/DNAハイブリッドはS1ヌクレアーゼで処理されうる。他の実施の形態では、ミスマッチ領域を分解するため、DNA/DNAまたはRNA/DNAのいずれかの二重鎖を、ヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムで、およびピペリジンを用いて処理することができる。ミスマッチ領域の分解後、得られた材料をポリアクリルアミドゲルの変性の際に大きさで分離し、対照核酸およびサンプル核酸が同一のヌクレオチド配列を有するか、あるいは、ヌクレオチドが異なっているかを決定する。例えば、Cotton et al (1988) Proc. Natl Acad Sci USA 85:4397; Saleeba et al (1992) Methods Enzymol. 217:286-295参照。別の実施の形態では、対照核酸またはサンプル核酸は検出用に標識化される。

10

20

【0209】

別の実施の形態では、変異は、熱変性高速液体クロマトグラフィー(DHPLC)によって同定することができる(Oefner and Underhill, (1995) Am. J. Human Gen. 57:Suppl. A266)。DHPLCは、逆相イオンペアクロマトグラフィーを使用して、その断片内の特定のヌクレオチド位置にヘテロ接合を有する個体由来のPCR断片の増幅の間に作出されたヘテロ二本鎖を検定する(Oefner and Underhill, (1995) Am. J. Human Gen. 57:Suppl. A266)。一般に、PCR産物は、対象DNAに隣接するPCRプライマーを使用して産生される。DHPLC分析が行われ、得られたクロマトグラムは、特異的なクロマトグラフ特性に基づいて、塩基対の変化または欠失を同定するため、分析される(O'Donovan et al. (1998) Genomics 52:44-49参照)。

30

【0210】

他の実施の形態では、マーカーの変異型を同定するために、電気泳動移動度における変化が用いられる。例えば、突然変異体の核酸と野生型の核酸の電気泳動移動度の差異を検出するために、一本鎖高次構造多型(SSCP)が用いられる(Orita et al. (1989) Proc Natl. Acad. Sci USA 86:2766, およびCotton (1993) Mutat Res 285:125-144; and Hayashi (1992) Genet Anal Tech Appl 9:73-79を参照)。サンプル核酸および対照核酸の一本鎖DNA断片を変性させ、復元させる。一本鎖核酸の二次的な構造は配列に従って変化し、電気泳動移動度で得られた変化は、1塩基の変化でさえも検出することができる。DNA断片は、標識化されるか、または標識化プローブを用いて検出されうる。アッセイの感受性は、RNAを使用することによって(DNAよりも)促進され、ここで、二次的な構造は配列の変化に対しさらに感受性である。別の実施の形態では、目的の方法は、ヘテロ二本鎖分析を利用して、電気泳動移動度における変化に基づいて二重鎖ヘテロ二本鎖分子を分離する(Keen et al. (1991) Trends Genet 7:5)。

40

【0211】

50

さらに別の実施の形態では、多型領域の変異のアイデンティティは、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (D G G E) を用いて、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲル内での多型領域を含む核酸の動きを分析することによって得られる (Myers et al. (1985) Nature 313:495)。分析方法として D G G E が用いられる場合、完全に変性しないことを確保するため、DNA は、例えば、PCR によって高融合性の GC が豊富な DNA の約 40 塩基対の GC c l a m p を付加することによって、改質される。さらなる実施の形態では、変性剤勾配の代わりに温度勾配を用いて、対照 DNA およびサンプル DNA の移動度の差異を同棲する (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys Chem 265:1275)。

【0212】

2つの核酸間の少なくとも1つヌクレオチドの差異を検出する方法の例としては、限定はしないが、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長が挙げられる。例えば、オリゴヌクレオチドプローブは、既知の多型ヌクレオチドが中枢に位置するように調製され (アレル特異的プローブ)、次いで、完全一致が見られる場合のみハイブリダイゼーションが許される条件下で、標的 DNA とハイブリッド形成される (Saiki et al. (1986) Nature 324:163); Saiki et al (1989) Proc. Natl Acad. Sci USA 86:6230; および Wallace et al. (1979) Nucl. Acids Res. 6:3543)。このようなアレル特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション法は、マーカ-の異なる多型領域における幾つかのヌクレオチド変化の同時検出に用いられうる。例えば、特異的な変異ヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション膜に付着され、次に、標識化したサンプル核酸を用いてこの膜をハイブリッド形成する。その後、ハイブリダイゼーションシグナルの分析により、サンプル核酸のヌクレオチドのアイデンティティが明らかになる。

【0213】

あるいは、選択的 PCR 増幅に応じて決まるアレル特異的増幅技術を、本発明と併用してもよい。特異的な増幅用のプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、分子の中心に (したがって、増幅は、異なるハイブリダイゼーションに応じて決まる) (Gibbs et al (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、あるいは、適切な条件下、ミスマッチを防ぐことができる、またはポリメラーゼ伸長を低減する、1つのプライマーの3'末端に (Prossner (1993) Tibtech 11:238; Newton et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:2503)、目的の変異をもたらしうる。この技法は、プローブオリゴ塩基伸長のための「プローブ (PROBE)」とも称される。加えて、変異領域に新規の制限酵素認識部位を導入して、切断に基づいた検出を生じさせることが望ましいであろう (Gasparini et al (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。

【0214】

別の実施の形態では、変異の同定は、例えば、米国特許第 4, 998, 617 号明細書および Landegren, U. et al., (1988) Science 241:1077 1080 に記載されるオリゴヌクレオチドライゲーション法 (OLA) を用いて行われる。OLA プロトコルは、標的の一本鎖の隣接する配列にハイブリダイゼーションできるように設計された、2つのオリゴヌクレオチドを利用する。前記オリゴヌクレオチドの1つは、分離マーカ-、例えば、ビオチン化されたものに連結され、他のものは検出可能なように標識化される。標的分子に正確な相補的配列が見られる場合、オリゴヌクレオチドは、それらの終端が隣接してライゲーション基質を生み出すようにハイブリッド形成する。次に、ライゲーションは、標識化オリゴヌクレオチドが、アピジン、または別のビオチンリガンドを使用して再生できるようにする。Nickerson, D. A. らは、PCR と OLA の特性を合わせた核酸検出法について報告している (Nickerson, D. A. et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 87:8923 8927)。この方法では、OLA を用いて検出される標的 DNA の指数関数的増幅を達成するために、PCR が用いられる。

【0215】

本発明はさらに、マーカ-における単一ヌクレオチド多型の検出方法を提供する。単一ヌクレオチド多型は変異体配列の領域が隣接する変異部位を構成することから、それらの

10

20

30

40

50

分析には、その変異部位に存在する単一のヌクレオチドのアイデンティティの決定しか必要とせず、各被験体の完全な遺伝子配列の決定は必要ではない。このような単一ヌクレオチド多型の分析を促進するために、幾つかの方法が開発されている。

【0216】

1つの実施の形態では、一塩基多型は、例えば、Mundy, C. R. (米国特許第4,656,127号明細書(参照することにより組み込まれる))に開示されるような、特殊化されたエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチドを用いることによって検出される。その方法によれば、多型部位に近接した3'側のアレル配列に相補的なプライマーを、特定の動物またはヒトから得られた標的分子とハイブリッド形成することができる。その標的分子上の多型部位が、存在する特定のエキソヌクレアーゼ耐性ヌクレオチド誘導体に相補的なヌクレオチドを含む場合、その誘導体は、ハイブリッド形成されたプライマーの末端上に組み込まれる。そのような組み込みは、そのプライマーをエキソヌクレアーゼに対して耐性にし、よってその検出を可能にする。そのサンプルのエキソヌクレアーゼ耐性誘導体のアイデンティティは既知であることから、そのプライマーがエキソヌクレアーゼに対して耐性を持つようになるという知見から、標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドが、その反応に用いられるヌクレオチド誘導体のものと相補的だったことが明らかになる。この方法は、大量の無関係な配列データを決定する必要がないという利点を有する。

10

【0217】

本発明の別の実施形態では、多型部位のヌクレオチドのアイデンティティを決定するために、溶液系の方法が使用される(Cohen, D.ら(仏国特許第2,650,840号明細書;国際出願公開第WO91/02087号パンフレット(参照することにより組み込まれる))。米国特許第4,656,127号明細書(参照することにより組み込まれる))のMundyの方法に見られるように、プライマーは、多型部位に近接した3'側のアレル配列に相補的なものが使用される。この方法は、多型部位のヌクレオチドに相補的である場合にプライマーの末端上に組み込まれるようになる標識化ジデオキシヌクレオチド誘導体を用いて、その部位のヌクレオチドのアイデンティティを決定する。

20

【0218】

Genetic Bit AnalysisまたはGBAとして知られている別の方法が、Goelet, P.らによって報告されている(国際出願公開第92/15712(参照することにより組み込まれる))。Goelet, P.らの方法は、標識化ターミネーターと、多型部位に対して3'側の配列に相補的なプライマーとの混合物を使用する。したがって、組み込まれた標識化ターミネーターは、評価される標的分子の多型部位に存在するヌクレオチドによって決定され、そのヌクレオチドと相補的である。Cohenら(仏国特許第2,650,840号明細書;国際出願公開第WO91/02087号パンフレット(参照することにより組み込まれる))の方法とは対照的に、Goelet, P.らの方法は、プライマーまたは標的分子が固相に固定化された、不均一相アッセイである。

30

【0219】

DNAにおける多型部位をアッセイするための、幾つかのプライマー誘導ヌクレオチド組み込み法が報告されている(Komher, J. S. et al., (1989) Nucl. Acids. Res. 17:77-79 7784; Sokolov, B. P., (1990) Nucl. Acids Res. 18:3671; Syvanen, A. C., et al., (1990) Genomics 8:684-692; Kuppaswamy, M. N. et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:1143-1147; Prezant, T. R. et al., (1992) Hum. Mutat. 1:159-164; Ugozzoli, L. et al., (1992) GATA 9:107-112; Nyren, P. (1993) et al., Anal. Biochem. 208:171-175)。これらの方法のすべてが、多型部位における塩基を識別するために、標識化デオキシヌクレオチドの組み込みに依拠する点で、これらの方法は、GBAとは異なる。このようフォーマットでは、シグナルが、組み込まれるデオキシヌクレオチドの数に比例することから、一続きの同一ヌクレオチドに生じる多型は、その一続きの長さ に比例するシグナルを生じうる(Syvanen, A.C., et al., (1993) Amer. J. Hum. Genet. 52:46-59)。

40

【0220】

50

マーカーのコード領域に位置する多型領域の変異の同一性を決定するため、上述の方法とは異なるさらに別の方法を用いることもできる。例えば、変異マーカーをコードする変異の同定は、例えば、免疫組織化学または免疫沈降において、突然変異タンパク質を特異的に認識する抗体を使用することによって行うことができる。野生型のマーカーまたは変異形態のマーカーに対する抗体は、当技術分野で既知の方法にしたがって調製することができる。

【0221】

あるいは、マーカーリガンドへの結合など、マーカーの活性を測定することもできる。結合分析は当技術分野で既知であり、例えば、被験体から細胞を入手し、標識化リガンドとの結合実験を行い、変異形態のタンパク質への結合が野生型のタンパク質への結合と異なるか否かを判定することを含む。

10

【0222】

VI. ALK阻害に基づく典型的なスクリーニング法

本発明は、さらに、ALKポリペプチド（例えば、EML4-ALKポリペプチド）を阻害する物質を同定し、それによって癌細胞の増殖、成長、分化、アポトーシス、および/または転移を阻害するための方法も提供する。この方法は、試験化合物をALKポリペプチド（例えば、表1記載のポリペプチド）と接触させることを含む。一部の実施の形態では、ALKポリペプチドは、1つ以上のALK阻害剤による阻害に対する部分反応性または非反応性のリスクを増大させる変異体（例えば、表1記載のポリペプチド）を含む。腫瘍転移の阻害剤である化合物は、ALKポリペプチド変異体の活性（例えば、ATP結合などのリガンド結合および/またはチロシンキナーゼ活性を含む）における試験化合物の効果を決めることによって同定される。特定の例では、試験化合物の不存在下における活性と比較してチロシンキナーゼ活性を阻害する試験化合物は、腫瘍転移の阻害剤として同定される。その化合物がALK変異体の活性を阻害する場合、該化合物は腫瘍成長または転移を阻害する能力についてさらに評価される。

20

【0223】

特に、表1記載の新しい本発明の生体指標（例えば、ALK突然変異体）を含めたチロシンキナーゼ突然変異体の活性化は、例えば、癌細胞増殖、成長、分化、アポトーシス、および/または転移を阻害または予防することによって新生物を治療、改善、または予防することを目的として使用することができる化合物の同定に有用である。調節（例えば、阻害、拮抗、または作動）する分子または模倣する分子の化学ライブラリのスクリーニングは、当技術分野で知られている。化学ライブラリは、例えば、ペプチドライブラリ、ペプチド模倣薬ライブラリ、化学合成ライブラリ、組み換えライブラリ（例えば、ファージディスプレイライブラリ）、およびインビトロ翻訳系ライブラリ、その他の非ペプチド合成有機ライブラリでありうる。

30

【0224】

表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）の適切な高親和性阻害剤のスクリーニングまたは作出、同定および選択は、さまざまな方法によって達成することができる。大まかに言えば、これらには、限定はしないが、2つの一般的な手法が含まれる。手法の1つは、標的タンパク質についての構造的知識を使用して、正確に相互作用する候補分子を設計することである。例として、特に、本明細書に図6として開示される新しい構造-機能情報に基づいた、コンピューター支援型の分子設計が挙げられる。第2の手法は、分子の組合せライブラリまたは他のライブラリを使用し、それによって、分子の広範なライブラリを標的酵素に対する親和性または標的酵素の阻害活性能力についてスクリーニングすることである。さらなる例では、抗体群は、標的酵素を阻害する能力についてスクリーニングされる。

40

【0225】

本明細書で提供される一部の実施の形態は、所定の化合物について、表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）を阻害する能力を判定することを含む。新生物の治療に有用であることが知られている化合物に対する試験化合物の活性を

50

比較することによって、直接的にまたは間接的に、腫瘍性病変を治療する見込み能力について試験化合物を評価することができる。例えば、表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）に対するATP結合および/またはチロシンキナーゼ活性などのリガンド結合を阻害する試験化合物の能力を、PF-02341066および/またはPDDなどの既知のALK阻害剤のものと比較することができる。1つの実施の形態では、これらの試験化合物は、同一のアッセイ条件下で、既知のALK阻害剤と比較して、表1記載の本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）を、少なくとも100%、少なくとも99.9%、少なくとも99.8%、少なくとも99.7%、少なくとも99.6%、少なくとも99.5%、少なくとも99.4%、少なくとも99.3%、少なくとも99.2%、少なくとも99.1%、少なくとも99%、少なくとも98.5%、少なくとも98%、少なくとも97.5%、少なくとも97%、少なくとも96.5%、少なくとも96%、少なくとも95.5%、少なくとも94%、少なくとも93.5%、少なくとも93%、少なくとも92.5%、少なくとも92%、少なくとも91.5%、少なくとも91%、少なくとも90.5%、少なくとも90%、少なくとも89.5%、少なくとも89%、少なくとも88.5%、少なくとも88%、少なくとも87.5%、少なくとも87%、少なくとも86.5%、少なくとも86%、少なくとも85.5%、少なくとも85%、少なくとも84.5%、少なくとも84%、少なくとも83.5%、少なくとも83%、少なくとも82.5%、少なくとも82%、少なくとも81.5%、少なくとも81%、少なくとも80.5%、少なくとも80%、少なくとも79%、少なくとも78%、少なくとも77%、少なくとも76%、少なくとも75%、少なくとも74%、少なくとも73%、少なくとも72%、少なくとも71%、少なくとも70%、少なくとも69%、少なくとも68%、少なくとも67%、少なくとも66%、少なくとも65%、少なくとも64%、少なくとも63%、少なくとも62%、少なくとも61%、少なくとも60%、少なくとも59%、少なくとも58%、少なくとも57%、少なくとも56%、少なくとも55%、少なくとも54%、少なくとも53%、少なくとも52%、少なくとも51%、少なくとも50%、またはその間のいずれかの範囲で阻害するであろう。ある特定の実施の形態では、細胞は、表1記載の本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）をコードする構成体をトランスフェクトされ、検出可能なマーカーを用いてタグ化または標識化された試験化合物との接触に供され、試験化合物を結合する存在について分析されうる。ある特定の実施の形態では、表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）がトランスフェクトされていない細胞と比較して、トランスフェクトされた細胞は、試験化合物との結合が観察され、これは、試験化合物がそれらの細胞によって発現された表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）と結合していることを示している。化合物の結合は、典型的には、ELISA、RIA、および/またはBIACoreアッセイなどの当技術分野で既知の広範なアッセイのうちのいずれかによって決定される。

【0226】

酵素の発現組み換え体、または別の種から単離された相同体またはオルソログを使用して、表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）の活性における阻害効果または他の効果について、化合物をスクリーニングすることができる。あるいは、試験化合物を用いて、これらの新しい生体指標ポリペプチドの1つを発現する細胞を処理することができ、例えば本明細書記載の技法の1つを使用して、特異的な標的のリン酸化反応における試験化合物の効果を決定することができる。一例を挙げれば、チロシンキナーゼ活性が決定される。活性（例えば、阻害）に影響を与えるチロシンキナーゼのリン酸化反応を決定する方法は、当業者に周知である。幾つか例を挙げれば、チロシンキナーゼ活性は、表1に記載される本発明の新しい生体指標（例えば、ALK突然変異体）によってリン酸化可能な基板内への標識化リン酸（³²P標識化リン酸など）の取り込みを評価することによって決定されうる（例えば、タンパク質またはペプチド断片、特に下流シグナル伝達成分のもの）。他の実施の形態では、チロシンキナーゼ活性は、ユニバーサルチロシンキナーゼ活性キット（例えば、Universalチロシンキナーゼアッセイキット（T

akara Bio, Inc.社製(米国ウイスコンシン州マディソン所在));チロシンキナーゼアッセイキット(Millipore社製(米国、マサチューセッツ州ビルリカ所在))を使用して測定することができる。

【0227】

別の実施の形態では、化合物が、例えば、表1に記載される本発明の新しい生体指標(例えば、ALK突然変異体)などの活性化チロシンキナーゼ変異を発現することが知られている腫瘍細胞などの腫瘍細胞の成長を低減するか否かを判定することをさらに含むスクリーニング法が提供される。さまざまな細胞株を使用することが可能であり、これら細胞株は、当業者に周知の試験すべき組織(例えば、BA/F3細胞)に基づいて選択される。例えば、多くの細胞株は、例えば米国国立癌研究所(NCI)の新しい抗癌剤について

10

【0228】

100 μ M、90 μ M、80 μ M、70 μ M、60 μ M、50 μ M、40 μ M、30 μ M、20 μ M、10 μ M、9 μ M、8 μ M、7 μ M、6 μ M、5 μ M、4.5 μ M、4 μ M、3.5 μ M、3 μ M、2.5 μ M、2 μ M、1.5 μ M、1 μ M、900nM、850nM、800nM、750nM、700nM、650nM、600nM、550nM、500nM、450nM、400nM、350nM、300nM、250nM、200nM、150nM、100nM、95nM、90nM、85nM、80nM、75nM、70nM、65nM、60nM、55nM、50nM、45nM、40nM、35nM、30nM、25nM、20nM、15nM、10nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM またはそれ以下の用量において約50%より高い割合で生じるような、大幅かつ統計的に有意な腫瘍細胞増殖阻害は、その化合物が腫瘍性病変の治療に有用であることをさらに示している。IC₅₀値を決定し、比較目的で使用してもよい。この値は、対照と比較して腫瘍細胞増殖を50%阻害するのに必要とされる薬物の濃度である。

20

【0229】

これらの値はさらに他の基準にも適用することができる。例えば、他の実施の形態では、本明細書において提供されるスクリーニング法はさらに、腫瘍細胞の培養において、試験化合物がアポトーシスを誘発するか否かを判定することを含む。2つの異なる型の細胞死は、形態学および生化学的基準：壊死およびアポトーシスによって表される。壊死は、細胞膜の透過性の増大を伴い、それによって細胞が膨張し、数分以内に細胞膜が破裂することに付随して発生する。アポトーシスは、膜ブレブ形成、細胞質凝集、および内在性のエンドヌクレアーゼの活性化に特徴とする。

30

【0230】

アポトーシスは、正常な組織のターンオーバーおよび臓器および四肢の胚発生の間に自然に発生する。アポトーシスはまた、イオン化放射線およびある特定の化学療法薬による、細胞毒性のTリンパ球およびナチュラルキラー細胞を含めたさまざまな刺激によっても誘発することができる。アポトーシスの不適切な調節は、癌、AIDS、またはアルツハイマー病などを含めた多くの病状における重要な役割を果たすと考えられる。

【0231】

試験化合物は、上述の条件下で維持される腫瘍細胞の培養を用いて、アポトーシスの誘発についてスクリーニングすることができる。このようなスクリーニング法の例を幾つか挙げれば、試験化合物を用いた細胞の処理は、コンフルエント培養の前または後、および、さまざまな濃度の試験化合物を用いた1~7日間の処理を含む。アポトーシスを起こした細胞は、培養物の接着部分および「浮遊」部分の両方において測定することができる。この接着部分と浮遊部分は、上清を除去し、接着細胞をトリプシン処理し、両方の調製物を合わせた後に遠心分離洗浄ステップ(10分間、2000rpm)を行うことによって回収される。試験化合物を用いて処理した後、例えば蛍光顕微鏡によって、アポトーシスおよび壊死について培養物をアッセイすることができ、続いて、アクリジン・オレンジおよび臭化エチジウムを用いて培養物を標識化することができる。アポトーシスを起こした細胞を測定するための多くの方法は、当業者に知られている;例えば、アポトーシスを起

40

50

こした細胞の数を測定する方法の1つは、DukeおよびCohenによって報告されている (Cur. Prot. Immuno., Coligan et al., eds., 3.17.1-3.17.1, 1992)。例えば、浮遊細胞および接着細胞は、トリプシン処理によって回収され、PBSで3回洗浄される。次に、等分した細胞を遠心分離する。沈殿物を培地に再懸濁し、アクリジン・オレンジおよび臭化エチジウムを含む染料混合物をPBS中で調製し、穏やかに混合する。次に、混合物を顕微鏡スライド上に置き、アポトーシスの形態学的特徴について検査する。アポトーシスはまた、試験化合物で処理した細胞におけるDNA断片化の増大を測定することによっても定量化することができる。細胞質ヒストン関連DNA断片(モノヌクレオソームおよびオリゴヌクレオソーム)のインビトロにおける定量的決定のため、市販のフォトメトリック酵素免疫測定法(EIA)を利用することができる(例えば、細胞死検出ELISA, Boehringer Mannheim社製)。

【0232】

追加の実施の形態では、本明細書において提供されるスクリーニング法は、試験化合物が、腫瘍転移、例えば動物モデルにおける転移を低減するか否かを判定することをさらに含む。腫瘍転移を評価する方法は、当業者に知られている(例えば、Khanna and Hunter, Carcinogenesis 26:513-523, 2005を参照)。転移モデルの1つは、ヒト癌細胞株または組織が免疫不全マウス(SCIDマウスまたはヌードマウスなど)に移植される、ヒト-マウス間の異種移植に関する。同様の方法においては、表1に記載される本発明の新しい生体指標(例えば、ALK突然変異体)を発現するように改変された細胞株が、免疫不全マウスに移植されうる。一例を挙げれば、腫瘍細胞または細胞株は、直接、体循環に注入される。注入部位は、これらの実験系における転移の発現部位を概ね定義する。実験的転移モデルに用いられる腫瘍細胞注入の最も一般的な部位は、マウスにおいては側尾静脈であり、この結果、最初に肺転移を生じる。対照的に、腫瘍細胞の脾内静脈または門脈内注入は、細胞の肝臓に転移が発現する最も一般的な部位であり、心腔内注射は骨を含めた幾つかの部位への転移を生じうる。腫瘍細胞または他の細胞株の循環系への注入に続いて、対象部位(肺など)における転移の発現が数日間または数週間にわたりモニタリングされる。

【0233】

腫瘍転移を評価する別の方法は同所移植を利用するものであり、ここで、癌細胞は腫瘍の由来する解剖学的位置または組織に移植される(例えば、腫瘍断片の直接注入または外科的移植による)。同所性腫瘍に起因する自然転移は、数日間または数週間にわたり評価することができる。腫瘍転移を低減または予防する試験化合物の能力は、試験化合物を動物に投与し、続いて、皮下、筋肉内、または循環系内に、もしくは同所移植によって、腫瘍細胞を注入することによって評価することができる。転移の発現の数、大きさ、または時間が評価されうる。腫瘍転移を阻害する化合物は、対照サンプルと比較して、転移の数を、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または100%低下しうる。腫瘍転移を阻害する化合物はまた、対照サンプルと比較して、転移の大きさも縮小させうる。同様に、腫瘍転移を阻害する化合物は、転移の発現の開始を、例えば、少なくとも1週間、2週間、1ヶ月、6ヶ月、1年、または無期限に遅延しうる。

【0234】

VII. 典型的なALK阻害剤

本明細書に開示される方法は、表1に記載される本発明の新しい生体指標(例えば、ALK突然変異体)の阻害剤を用いた治療候補として被験体を同定し、腫瘍の細胞死を誘発し、腫瘍成長を低減し、または腫瘍転移のリスクを低下させることを含む。ALKポリペプチドの阻害剤は当業者に既知である。例えば、PF-02341066、PDD、2-メチル-11-(2-メチルプロピル)-4-オキソ-4,5,6,11,12,13-ヘキサヒドロ-2H-インダゾロ[5,4-a]ピロロ[3,4-c]カルバゾール-8

-イル [4 - (ジメチルアミノ)ベンジル]カルバメート、(1S, 2S, 3R, 4R)
 - 3 - ({ 5 - クロロ - 2 - [(1 - エチル - 2 , 3 , 4 , 5 - テトラヒドロ - 6 - メト
 キシ - 2 - オキソ - 1 H - 1 - ベンゾアゼピン - 7 - イル) アミノ] - 4 - ピリミジニル
 } アミノ) ピシクロ [2 . 2 . 1] ヘプト - 5 - エン - 2 - カルボキサミド、および N V
 P - T A E 6 8 4 が挙げられる (例 えば、PNAS 104:270-275, 2007; Choi, Y.L. et al.
 (2008) Cancer Res. 68:4971-2976 ; および Biochemistry 48:3600-3609, 2009 参照。これ
 らは、参照することによって本明細書に組み込まれる) 。

【 0 2 3 5 】

参照による組み込み

本明細書に記載されるすべての刊行物、特許、および特許出願は、参照することにより
 各個別の刊行物、特許、および特許出願が組み込まれることを明確かつ個別に示唆されて
 いる場合、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には
 、本明細書における定義を含めて、本願は制御される。

【 0 2 3 6 】

ワールドワイドウェブの tigr.org のゲノム研究所 (T I G R) および / またはワールド
 ワイドウェブの ncbi.nlm.nih.gov の全米バイオテクノロジー情報センター (N C B I) に
 よって管理されるものなど、公開データベースの登録に関連付けられるアクセッション番
 号に言及するポリヌクレオチド配列およびポリペプチド配列は、参照することによりその
 全体が組み込まれる。

【 実施例 】

【 0 2 3 7 】

本発明は、限定すると解釈されるべきではない次の実施例によって、さらに例証される
 。本明細書中で引用されたすべての参考文献、図面、配列表、特許および公開された特許
 出願の内容は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

【 0 2 3 8 】

実施例 1 - 例 えば 2 ~ 4 の材料および方法

a . D N A の配列決定

E Z 1 s y s t e m (Qiagen 社 製 (米 国 カ リ フ オ ル ニ ア 州 ヴ ァ レ ン シ ア 所 在)) を 使 用
 し て 抽 出 し た 試 料 R N A から オ リ ゴ (d T) で プ ラ イ ミ ン グ し た c D N A を 生 成 し、 P r
 i m e S T A R (登 録 商 標) H S D N A p o l y m e r a s e (T a k a r a B i o
 I n c . 社 製 (日 本 国 滋 賀 県 所 在)) お よ び、 プ ラ イ マ ー で あ る A L K - T K - F (5 '
 - T A C A A C C C C A A C T A C T G C T T T G C T - 3 ') お よ び A L K - T K - R
 1 (5 ' - A G G C A C T T T C T C T T C C T C T T C C A C - 3 ') を 用 い た 3 0 サ
 イ ク ル (9 8 で 1 0 秒 間 お よ び 6 8 で 1 分 間 で 構 成 さ れ る) の ポ リ メ ラ ー ゼ 連 鎖 反 応
 (P C R) に 供 し た。次 に、A L K の キ ナ ー ゼ ド メ イ ン に 対 応 す る P C R 産 物 を 断 片 化 し
 、 I l l u m i n a G e n o m e A n a l y z e r I I (G A I I) を 用 い て、 p a
 i r e d - e n d s e q u e n c i n g s y s t e m (I l l u m i n a 社 製 (米 国 カ
 リ フ オ ル ニ ア 州 サ ン デ ィ エ ゴ 所 在)) を 使 用 し て 両 端 か ら 7 6 塩 基 に つ い て 配 列 決 定 し た
 。す べ て の 塩 基 に つ い て、P C R プ ラ イ マ ー 配 列 の 存 在 お よ び Q 値 2 0 に 基 づ い て、未
 処 理 の 読 み 取 り デ ー タ を 質 的 に フ ィ ル タ リ ン グ し た。次 に、B o w t i e ア ル ゴ リ ズ ム を
 用 い て (ワ ー ル ド ワ イ ド ウ ェ ブ の bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml で 利 用 可 能)
 、フ ィ ル タ を 通 過 し た 読 み 取 り を A L K の c D N A 配 列 と ア ラ イ ン メ ン ト し た。

【 0 2 3 9 】

3 1 3 0 x 1 G e n e t i c A n a l y z e r (A p p l i e d B i o s y s t e m s 社 製 (米 国 カ リ
 フ オ ル ニ ア 州 フ ォ ス タ ー シ テ ィ 所 在)) を 利 用 し た キ ャ ピ ラ リ ー 配 列 決 定 で は、同 一 の プ
 ラ イ マ ー セ ッ ト ま た は、E A - F - g - S (5 ' - C C A C A C C T G G G A A A G G A
 C C T A A A G - 3 ') プ ラ イ マ ー と A L K - T K - R 2 (5 ' - C C T C C A A A T A
 C T G A C A G C C A C A G G - 3 ') プ ラ イ マ ー の 組 合 せ を 用 い て c D N A から P C R
 産 物 を 調 製 し た。

【 0 2 4 0 】

10

20

30

40

50

b. 突然変異体 EML4 - ALK

F L A G タグ化した E M L 4 - A L K とマウス C D 8 を同時発現させるために、F L A G エピトープタグ化 E M L 4 - A L K V a r i a n t 1 をコードした c D N A (Soda, M. et al. (2007) Nature 448:561-566) を p M X - i r e s C D 8 レトロウイルスベクター (Yamashita Y. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:39012-39020) に挿入した。A L K の C 1 1 5 6 Y および L 1 1 9 6 M 変異に対応するヌクレオチド変化を、個別に、または E M L 4 - A L K (C 1 1 5 6 Y)、E M L 4 - A L K (L 1 1 9 6 M)、または E M L 4 - A L K (C 1 1 5 6 Y / L 1 1 9 6 M) の発現と組み合わせて、プラスミドに導入した。パッケージング細胞株 B O S C 2 3 (Pear, W.S. et al. (1993) Proc. Natl. Aca. Sci. USA 90:8392-8396) を利用して、これらのプラスミドに基づいた組み換えレトロウイルスを生成し、その組み換えレトロウイルスを使用してマウスのインターロイキン 3 依存性細胞株 B A / F 3 (Palacios, R. et al. (1985) Cell 41:727-734) を感染させた。m i n i M A C S 細胞分離カラムおよび C D 8 に対する抗体と結合させた電磁ビーズ (双方とも Miltenyi Biotec 社製 (ドイツ国グラーズバハ所在)) を使用して、得られた C D 8 陽性細胞を精製した。Selleck 社から P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 を入手した。

10

【0241】

E M L 4 - A L K のチロシンリン酸化の検査のため、融合タンパク質を発現する B A / F 3 細胞を 1 5 時間、A L K 阻害剤に曝露し、その後、F L A G に対する抗体 (S i g m a - A l d r i c h 社 (米国ミズーリ州セントルイス所在)) を用いて細胞溶解物から E M L 4 - A L K を免疫沈降させ、T y r ¹⁶⁰⁴ - リン酸化 A L K に対する抗体 (Cell Signaling Technology 社製 (米国マサチューセッツ州デンバー所在)) を用いてイムノプロット解析に供した。合成 Y F F ペプチド (Operon Biotechnologies 社製 (米国アラバマ州ハンツビル所在)) を使用して、先に説明したとおり、室温で 3 0 分間、インビトロキナーゼ分析を行った (Donella-Deana, A. et al. (2005) Biochemistry 44:8533-8542)。

20

【0242】

実施例 2 - A L K チロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性に関連する新しい A L K 突然変異患者は、喫煙歴のない 2 8 歳の男性であり、2 0 0 8 年 4 月に T 4 N 3 M 1 の臨床病期にある肺腺癌と診断された。腫瘍は E G F R 変異を包含しなかったことを考えれば、患者は従来の化学療法によって治療され、疾患が進行し、脳および骨に多発性転移の形成を生じる結果となった。2 0 0 8 年 1 1 月には、痰の逆転写 P C R 分析ならびに生検試料の蛍光 in situ ハイブリダイゼーション分析によって、腫瘍に E M L 4 - A L K V a r i a n t 1 の m R N A の存在が確認された。したがって、P F - 0 2 3 4 1 0 6 6 のトライアルに患者を登録し、患者の一般状態に顕著な改善が見られた (レベル 4 から 2 への引き下げ)。患者は治療に対して「部分反応」を示したが、患者の胸水は完全には根絶されなかった。治療 5 ヶ月後、腫瘍は突然、再び増殖し始め、両肺に胸水および多発性の癌結節の形成が増大する結果となった。患者は 2 0 0 9 年 5 月にトライアルから除外され、その後、分子分析のために胸水を採取した。

30

【0243】

A L K 阻害剤を持続投与したにもかかわらず、腫瘍が増殖を再開したことを考慮して、腫瘍が、薬剤への耐性を付与する二次的な遺伝子変化を獲得したか否かを判定した。さらには、T K I への耐性が標的キナーゼ内に獲得変異を生じることを考慮し、E M L 4 - A L K 自体がアミノ酸変化を被る可能性について調べた。

40

【0244】

痰 (I D J - # 1) および胸水 (I D J - # 1 1 3) 試料は、それぞれ、治療前および治療後の患者の腫瘍の分子分析に使用可能であった。2 つの試料の腫瘍細胞の割合が異なっているであろうことを考慮して、次世代シーケンサーを用いて、これらの試料に由来する E M L 4 - A L K の c D N A の大規模シーケンシング (deep sequencing) を行った。両方の試料から A L K のチロシンキナーゼドメインに対応する c D N A を増幅し (図 1 A)、断片化し、G A I I s y s t e m を使用してヌクレオチド配列決定に供した。比較のため、E M L 4 - A L K 陽性 N S C L C 細胞株 H 2 2 2 8、および融合タンパク質

50

陽性の他の3種類の臨床試料についても同様に分析した。4種類の試料に由来するcDNAにおいて、既知の単一ヌクレオチド多型rs3795850が検出された(図1B)。加えて、J-#1のcDNAにおいて、ヒト野生型ALKのcDNA(GenBankアクセッション番号:NM_004304)の4230部位のヌクレオチドに対応する位置に、T→Cの変化が低頻度(8.9%)で検出された。さらには、J-#113のcDNAにおいて、野生型ALKのcDNAの4374部位および4493部位のヌクレオチドに対応する位置に、2つの新しい変化、すなわちG→AおよびC→Aの変化が、それぞれ41.8%および14.0%の頻度で検出された。いずれかの試料に由来するキナーゼ領域のcDNAには、他に再発性の変化(読み取りデータ中、5%に存在)は存在しなかった。

10

【0245】

その後、サンガー法シーケンサーを使用して、これらのヌクレオチド変化について確認した。変異がEML4-ALKではなく内在性の野生型ALKに生じたという可能性を排除するため、融合cDNAのみが増幅されるように、EML4のcDNAを標的とする順方向プライマーを用いてPCRを行った(図1A)。T4230Cの変化は、J-#1に由来する何百もの融合cDNAには検出されず、このことは、初期PCRまたはGAIIシーケンシングの段階において生じるアーチファクトであることを示唆している。

【0246】

しかしながら、G4374AおよびC4493Aの両変化は、サンガーシーケンス法によって容易に確認できた。J-#113について配列決定した73の融合cDNAクローンのうち、34のクローン(46.6%)はG4374A陽性であり、11のクローン(15.1%)はC4493A陽性であり、残るクローン(38.4%)は野生型であった(図1C)。PCR分析は、同一の生成物における両ヌクレオチド部位についても及んでいたが、生成物はいずれも変異を両方一緒には含まず、このことは、各変異が独立して発生することを示唆している。G4374またはC4493の部位を含むゲノム断片についてもPCRを用いて増幅し、ヌクレオチド配列決定に供し、腫瘍ゲノムにおける各変化について確認した(図2)。

20

【0247】

G4374AおよびC4493Aの置換の結果、それぞれ野生型のヒトALKのアミノ酸の1156部位および1196部位に対応する位置にCys→TyrおよびLeu→Metの変化を生じる。

30

【0248】

実施例3-新しいALK突然変異はALKチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性を与える
これらのアミノ酸変化がALK阻害剤に対するEML4-ALKの感受性に影響を及ぼすか否かについて試験した。野生型EML4-ALK、単一の突然変異体であるEML4-ALK(C1156Y)およびEML4-ALK(L1196M)、および二重変異体EML4-ALK(C1156Y/L1196M)を、BA/F3細胞に個別に発現させ、次に、細胞をALK阻害剤に曝露した。PF-02341066は、濃度依存性で、野生型のEML4-ALKを発現するBA/F3細胞の増殖を阻害した(図4A)。対照的に、C1156YまたはL1196Mの突然変異体を発現する細胞は、この薬剤に対する感受性を顕著に低下させることを明らかにし、繰り返し実験により、EML4-ALK(L1196M)を発現するBA/F3細胞が、EML4-ALK(C1156Y)を発現するものよりもPF-02341066に対して耐性が大きいことが示された(図3)。両変異の存在は、PF-02341066に対する細胞の耐性に相加効果を生じなかった。よって、これらのデータは、C1156YおよびL1196Mの変異が、それぞれ、この薬剤に対する耐性を与えることを示した。

40

【0249】

Tyr1604におけるALKのリン酸化に特異的な抗体を使用したイムノプロット解析を用いて、EML4-ALKのチロシンリン酸化について試験した。BA/F3細胞のPF-02341066への曝露は、野生型のEML4-ALKのチロシンリン酸化を顕

50

著に阻害したが、EML4-ALK(C1156Y)またはEML4-ALK(L1196M)のチロシンリン酸化には実質的効果を有しなかった(図4B)。これらの発見と一致して、インビトロキナーゼ分析から、EML4-ALKのC1156YおよびL1196M突然変異体が、野生型タンパク質よりも、PF-02341066による酵素活性の阻害に対する感受性が低いことが明らかになった(図4C)。細胞増殖の阻害に関しては(図4A)、L1196M突然変異体は、C1156Y突然変異体と比較して、PF-02341066によるキナーゼ活性の阻害に対してさらに難治性であった(図4C)。

【0250】

実施例4 - 新しいALK突然変異とALKチロシンキナーゼ阻害剤に対する耐性との間の構造 - 機能の関係

図5は、関連キナーゼであるインスリン受容体の結晶構造に基づいた、ALKのキナーゼドメインの三次元構造モデルにおけるCys1156およびLeu1196の部位を示している。前者の残基は、予測らせんCのアミノ末端に隣接し、かつ、ATP結合ポケットの上蓋の近くに配置される。他のチロシンキナーゼのこの位置では活性化突然変異は報告されていない。ALKのLeu1196は、ABL1のThr315およびEGFRのThr790に対応し、これらはそれぞれ、これらのキナーゼにおいてTKIに対する耐性を与える、最も高頻度で獲得された変異の部位である(Deininger, M. et al. (2005) Blood 105:2640-2653; Linardou, H. et al. (2009) Nat. Rev. Clin. Oncol. 6:352-366)。この「ゲートキーパー」部位は、ATP結合ポケットの底部表面に位置し(図5)、この位置における嵩ばった側鎖を有するアミノ酸の存在が、多くのTKIの結合を妨げることが知られている(Shah, N.P. et al. (2002) Cancer Cell 2:117-125; Tsao, M.S. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:133-144)。

【0251】

このように、多くのALK阻害剤に対して耐性を与えるEML4-ALKのキナーゼドメイン内の2つのde novo突然変異が同定された。EML4-ALKのcDNAには両方の変異を含んでいるものは観察されなかったことから、各変異は、腫瘍の明白なサブクローンにおいて、個別に発現したと考えられる。

【0252】

理論に縛られるわけではないが、治療前に患者の痰から調製されたcDNAが、C1156YまたはL1196Mの変異に対応するヌクレオチド変化を含まなかったことを考慮すると、おそらく、腫瘍サブクローンは、PF-02341066を用いた治療の間にde novo変異を獲得したと考えられる。しかしながら、治療前の胸水については検査できなかったことから、C1156YまたはL1196Mの突然変異体を包含する腫瘍細胞は、患者の最初の入院時にすでに胸水中に存在していた可能性も完全には排除できない。しかし、もしそうであれば、腫瘍は、PF-02341066を用いた5ヶ月間の治療の間に、その後の急速な増殖を可能にする他の未知の変異を獲得したであろう。C1156YまたはL1196Mの変異を有する腫瘍細胞のサブクローンは、初期治療に対しても難治性であってよかつたはずであり、また、治療方針に沿って進める間に拡大してもおかしくなかったはずである。しかしながら、反対に、少なくとも5カ月間は、患者に腫瘍拡大の兆候はなかったことから、C1156YおよびL1196Mの変異は、PF-02341066を用いた治療の間に発現したことを示唆している。この考えは、以前にTKIを用いて治療した患者では、ゲフィチニブまたはエルロチニブに対する耐性を与えるEGFRのT790M変異が頻繁に検出されるのに対し、未治療の患者個人には稀にしか見られない(Pao, W. et al. (2005) PLoS Med. 2:e73)という事実によって支持される。

【0253】

幾つかのチロシンキナーゼのゲートキーパー位置におけるアミノ酸置換が、TKIで治療された腫瘍において検出されている(Kobayashi, S. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 352:786-792; Pao, W. et al. (2005) PLoS Med. 2:e73; Shah, N.P. et al. (2002) Cancer Cell 2:117-125; Cools, J. et al. (2003) N. Engl. J. Med. 348:1201-1214; Tamborini, E. et al. (2004) Gastroenterology 127:294-299)。この部位における変異は

、EML4-ALKまたはALKについては以前に報告されてはいないが、ALKの別の融合型オンコキナーゼであるNPM-ALKのゲートキーパー位置におけるさまざまな人工的なアミノ酸置換の影響が最近になって検査されている(Lu, L. et al. (2009) Biochemistry 48:3600-3609)。腫瘍細胞のインビボにおける現在の分析と一致して、この位置へのMetの導入は、NPM-ALKを多くのALK阻害剤に対して最も耐性にすることが判明した。

【0254】

ゲートキーパー置換とは対照的に、Cらせんに対するアミノ末端の直近の位置にある活性化突然変異(ALKのCys1156)は、他のチロシンキナーゼについては報告されていない。EGFRの対応する部位におけるThr Ileの変化はNSCLCの1つの事例において説明されているが、薬物感受性との関連性は調査されていない(Tsao, M. S. et al. (2005) N. Engl. J. Med. 353:133-144)。酵素活性のアロステリック制御についてのらせんCの重要性は、セリン・トレオニンキナーゼに関して立証されている(Hindie, V. et al. (2009) Nat. Chem. Biol. 5:758-764)。したがって、ALKのCys1156における変化は、TKI結合をアロステリックに妨げている可能性があり、あるいは、Cys1156は、キナーゼドメインとTKIとの物理的相互作用に直接的に関連している可能性がある。

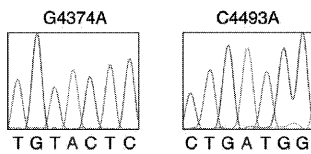
【0255】

等価物

当業者は、本明細書に記載される発明の特定の実施の形態に対する多くの等価物を認識するか、または、単に日常的な実験のみを利用して解明することができるであろうであろう。このような等価物は添付の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

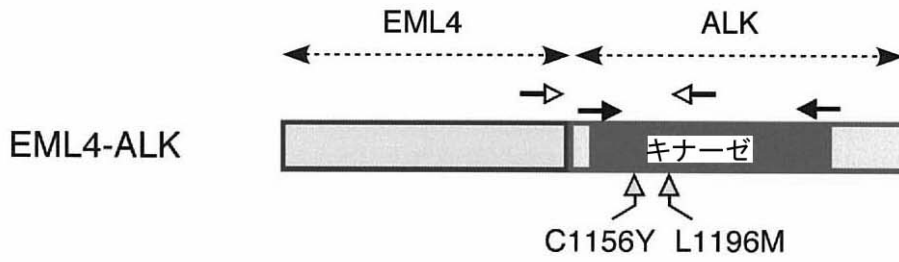
【図2】

Figure 2

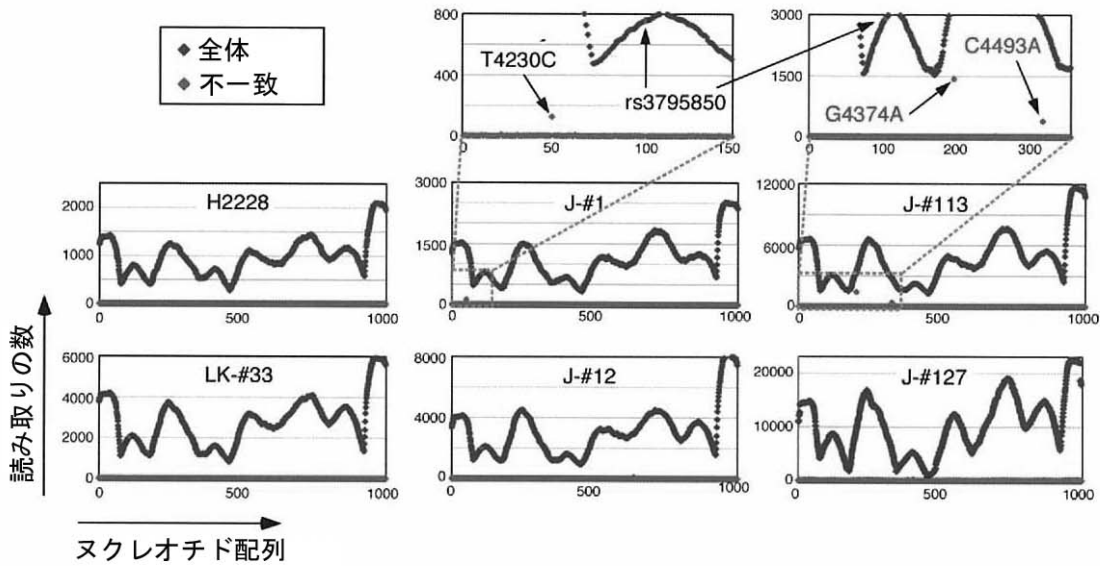


【図1】

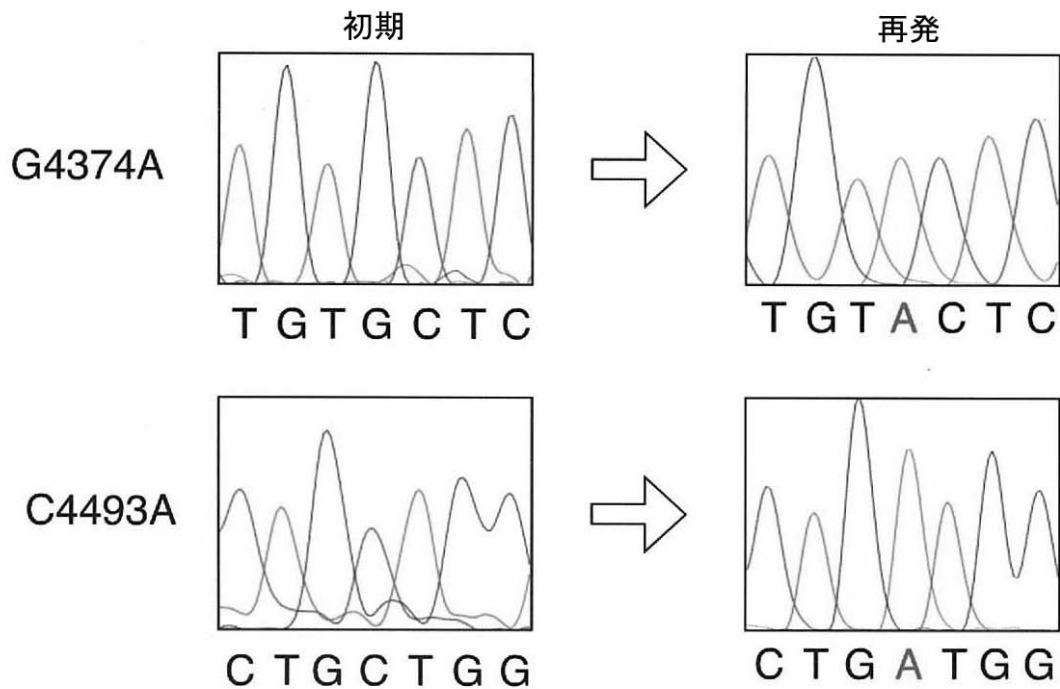
A



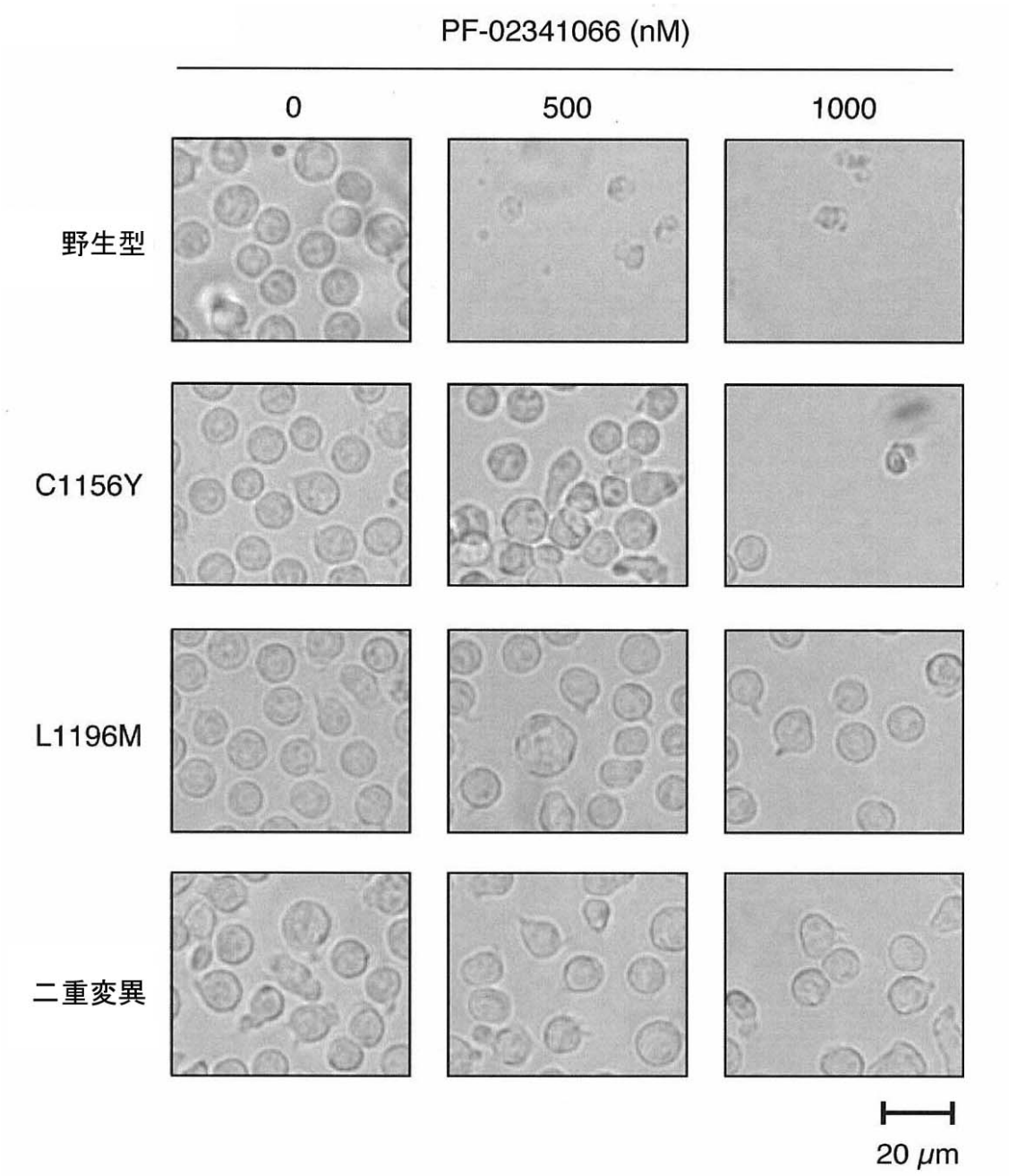
B



C

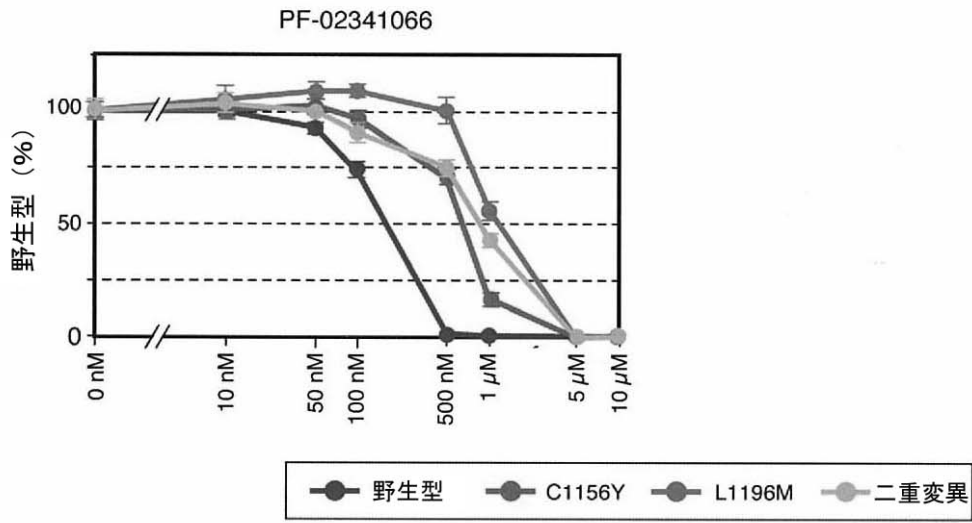


【 図 3 】

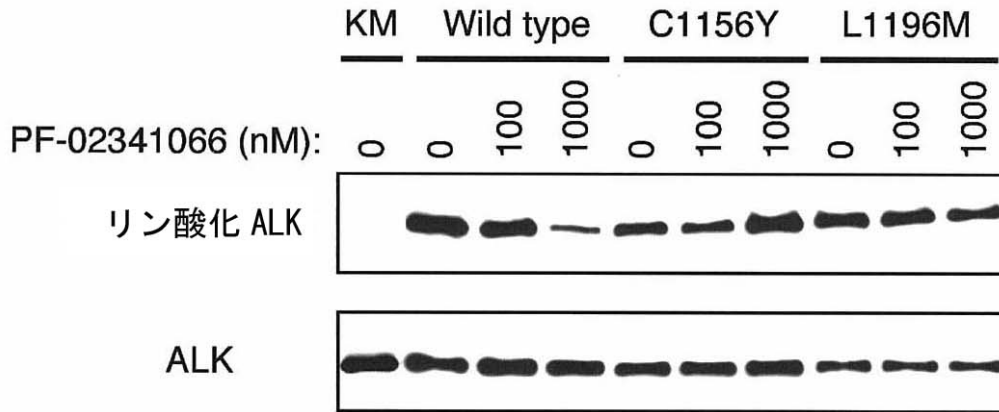


【 図 4 】

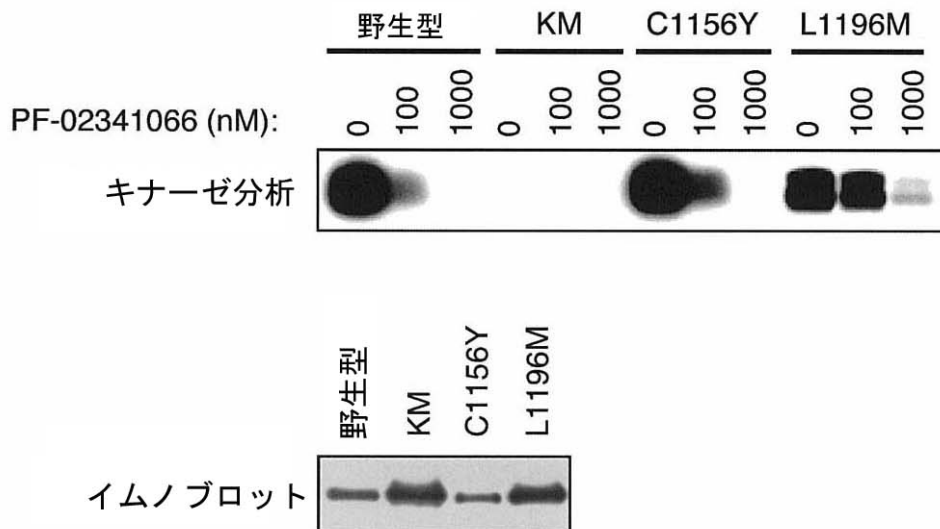
A



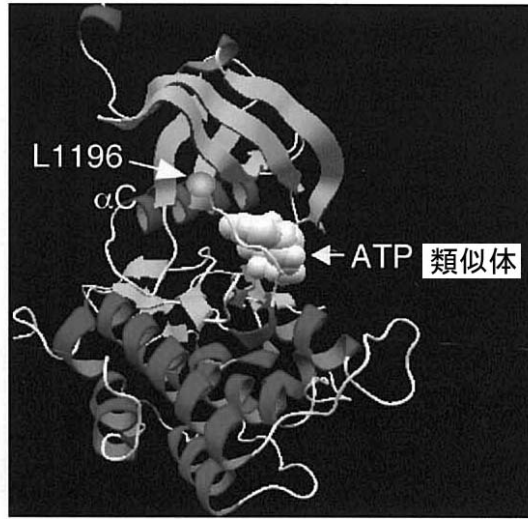
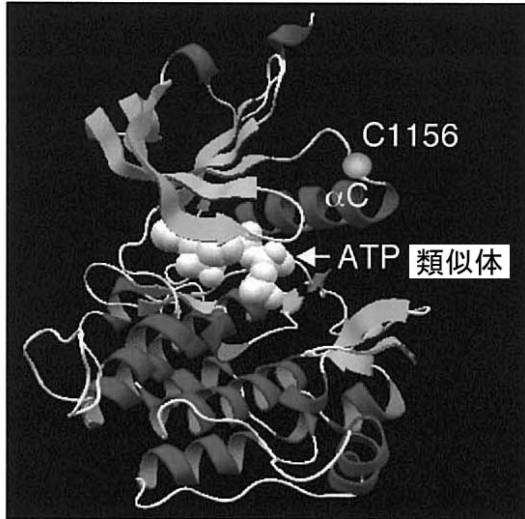
B





C



【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2011/000382
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>G01N 33/68(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/15(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i</i>		
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) G01N 33/68; C07H 21/04; A61K 38/16		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: ALK, anaplastic lymphoma kinase, cancer, mutant, ALK inhibitor, unresponsiveness		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LU L. et al. ALK mutants in the kinase domain exhibit altered kinase activity and differential sensitivity to small molecule ALK inhibitors. <i>Biochemistry</i> , 2009, Vol. 48, No. 16, pp.3600-9.	21,22
A	See the whole document, especially Abstract.	23-32
X	SODA M. et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. <i>Nature</i> , 2007, Vol. 448, No. 7153, pp.561-6.	21,22
A	See the whole document, especially Abstract ; Figures 3.4: Page 564.	23-32
X	CHOI YL. et al. Identification of novel isoforms of the EML4-ALK transforming gene in non-small cell lung cancer. <i>Cancer Res.</i> , 2008, Vol. 68, No. 13, pp.4971-6.	21,22
A	See the whole document, especially Abstract ; Page 4976 column 1 paragraph 2	23-32
X	US 2009-0156475 A1 (RIKOVA KLARISA et al.) 18 June 2009	27,31,32
A	See the whole document, especially Claims 1,15,34-39.	21-26,28-30
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 DECEMBER 2011 (15.12.2011)		Date of mailing of the international search report 16 DECEMBER 2011 (16.12.2011)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Moon, Dong Hyun  Telephone No. 82-42-481-8298

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/IB2011/000382

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009-0156475 A1	18.06.2009	CN 101466721 A	24.06.2009
		EP 2016089 A1	21.01.2009
		JP 2010-501175 A	21.01.2010
		KR 10-2010-0005180 A	14.01.2010
		US 2010-0240034 A1	23.09.2010
		US 2010-0304382 A1	02.12.2010
		US 2011-0021546 A1	27.01.2011
		US 7700339 B2	20.04.2010
		WO 2008-127248 A1	23.10.2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/000382**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IB2011/000382

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1-20 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, as well as diagnostic methods, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 2 0 6
A 6 1 K 31/4162	(2006.01)	A 6 1 K 31/4162	
A 6 1 K 31/55	(2006.01)	A 6 1 K 31/55	
A 6 1 K 31/4545	(2006.01)	A 6 1 K 31/4545	
A 6 1 K 31/22	(2006.01)	A 6 1 K 31/22	
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04	(2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 31/506	(2006.01)	A 6 1 K 31/506	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72)発明者 曾田 学

3 2 9 - 0 4 3 4 栃木県下野市祇園5丁目5番4号東

Fターム(参考) 2G045 AA26 CA25 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 DA12 DA36
 4B024 AA12 BA80 HA12
 4B063 QA19 QQ02 QQ43 QQ79
 4C084 AA17 NA14 ZB26 ZB27 ZC20
 4C086 AA01 AA02 BC36 BC42 CB03 GA01 GA07 GA08 NA14 ZB26
 ZB27 ZC20
 4C206 AA01 AA02 DB06 NA14 ZB26 ZB27 ZC20

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2013518579A5	公开(公告)日	2013-08-29
申请号	JP2012551704	申请日	2011-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	忌吃医学院		
申请(专利权)人(译)	学校法人自治医科大学		
[标]发明人	間野博行 チヨイヨンエル 曾田学		
发明人	間野 博行 チヨイ,ヨン エル 曾田 学		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 A61P35/00 A61K45/00 A61K31/4162 A61K31/55 A61K31/4545 A61K31/22 A61P35/02 A61P35/04 A61K31/506 A61P43/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/136 C12Q2600/154 C12Q2600/156 G01N33/57484 G01N2333 /9121 A61P35/00 A61P35/02 A61P35/04 A61P43/00 C12Q1/485 G01N33/15 G01N33/6893		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/50.P G01N33/68 G01N33/53.M A61P35/00 A61K45/00 A61K31/4162 A61K31/55 A61K31/4545 A61K31/22 A61P35/02 A61P35/04 A61K31/506 A61P43/00.111 C12N15/00. A		
F-TERM分类号	2G045/AA26 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045 /DA12 2G045/DA36 4B024/AA12 4B024/BA80 4B024/HA12 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ43 4B063/QQ79 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB26 4C084/ZB27 4C084/ZC20 4C086/AA01 4C086 /AA02 4C086/BC36 4C086/BC42 4C086/CB03 4C086/GA01 4C086/GA07 4C086/GA08 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC20 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/DB06 4C206/NA14 4C206 /ZB26 4C206/ZB27 4C206/ZC20		
代理人(译)	佐久间刚		
优先权	61/337465 2010-02-04 US		
其他公开文献	JP5937017B2 JP2013518579A		

摘要(译)

具有ALK突变阳性的癌症的受试者是否可能对用ALK抑制剂治疗有反应和/或患有这种癌症的患者的疾病进展相对缓慢描述了用于确定可能性是否高的组合物，试剂盒和方法。此外，还将描述用于预测患有这种癌症的受试者的疾病的时间变化的方法。